

Curso  
2017-2018



## TRABAJO FIN DE GRADO

*Desarrollo y optimización de técnicas de extracción y análisis de compuestos con actividad biológica en aronia negra (Aronia melanocarpa)*

---

Juan José Toledo Domínguez  
4º Curso Grado en Química

---

**TUTORAS:**  
Estrella Espada Bellido  
Marta Ferreiro González



**UCA**

Universidad  
de Cádiz

Facultad de Ciencias

**Desarrollo y optimización de técnicas de  
extracción y análisis de compuestos con  
actividad biológica en  
aronia negra (*Aronia melanocarpa*)**

**Juan José Toledo Domínguez**

**Grado en Química**

**Curso 2017-2018**

MEMORIA PRESENTADA POR  
JUAN JOSÉ TOLEDO DOMÍNGUEZ  
PARA OPTAR AL GRADO EN QUÍMICA

**Fdo.: Juan José Toledo Domínguez**

**Dra. Dña. Estrella Espada Bellido y Dra. Dña. Marta Ferreiro González**, Profesoras del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

**HACEN CONSTAR:**

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Desarrollo y optimización de técnicas de extracción de compuestos con actividad biológica en aronia negra (*Aronia melanocarpa*)”**, ha sido realizado bajo su tutorización por D. Juan José Toledo Domínguez para optar al Grado en Química por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación

En Puerto Real, a 17 de julio de 2018

Fdo.: Dra. Dña. Estrella Espada Bellido

Fdo.: Dra. Dña. Marta Ferreiro González

*"Que tu alimento sea tu medicina  
y tu medicina tu alimento"*

*Hipócrates*

## AGRADECIMIENTOS

Acaba una etapa de mi vida, pero sin duda, estos meses han sido los más duros e intensos de estos 4 años de carrera, de constante trabajo, enfrentándome cada día a nuevas situaciones, algunas mejores y otras peores pero todo ese esfuerzo ha merecido la pena y aquí está el resultado de todo ese trabajo, un trabajo que no habría sido posible sin la colaboración de personas que me han ayudado, orientado y guiado en este duro camino.

En primer lugar, agradecer a mis tutoras Dra. Dña. Marta Ferreiro González y Dra. Dña. Estrella Espada Bellido. A Marta, por estar ahí en momentos de apuros, por su sonrisa, o simplemente, por ayudarme a localizar a quién me hacía falta en cada momento. A Estrella, por esas conversaciones que hemos tenido en las que me ayudaba a tranquilizarme en momentos de estrés, por estar siempre ahí para que los diseños estuvieran perfectos y por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de ser su alumno colaborador desde segundo de carrera.

Por otra parte, no puedo olvidarme de Dr. D. Gerardo Fernández Barbero, una persona que ha sido, sin duda, clave en este trabajo, que ha estado siempre que lo he necesitado, que ha tenido muchísima paciencia conmigo, y sé que a veces no ha sido fácil, pero si este trabajo ha salido adelante, gran parte de responsabilidad es suya.

Mercedes Vázquez y Ana Velasco, dos personas a las que he tenido la gran suerte de conocer más en profundidad durante estos meses, que han sido mi sombra y mis salvadoras siempre, que se han portado como unas auténticas tutoras y que he aprendido muchísimo gracias a ellas. Han sido una parte fundamental de mi trabajo y para mí ha sido un auténtico placer tenerlas a mi lado.

Si el CAIV ha sido mi segunda casa durante todo el tiempo que ha durado mi trabajo, mi segundo padre ha sido Dr. D. Ceferino Carrera. Sin su ayuda, muchos de los resultados obtenidos no habrían podido salir adelante. De forma totalmente desinteresada, y de forma más directa o indirecta, siempre me ha ayudado, todos los días, y sin él, ante problemas que han ido surgiendo, no hubiera podido encontrar una solución. También me gustaría agradecer a Carlos los momentos en los que, también desinteresadamente me ha ayudado y ha colaborado conmigo.

Pilares fundamentales en estos años, como María, Pablo e Iván, mis “ninios”, a los que adoro y quiero muchísimo, también me han aportado mucho más de lo que ellos creen. Ellos saben lo que han significado para mí en muchos momentos, tanto en los buenos como en los malos y eso es algo que me ha ayudado a sobrellevar la carrera y, como no, estos meses.

Finalmente, y no menos importante, dar las gracias a mis padres y a mi hermano. Si he llegado hasta aquí es gracias a ellos, a los esfuerzos que siempre han hecho para facilitarme el cumplir mis deseos, apoyándome incondicionalmente. La nueva etapa que empiezo ahora la viviré, como no, junto a ellos, y sé que estarán a mi lado para todo lo que necesite, como siempre lo han estado.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Aspectos generales .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2. Aplicaciones .....</b>	<b>5</b>
<b>3.3. Sustancias antioxidantes .....</b>	<b>5</b>
<b>3.3.1. Compuestos fenólicos .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3.2. Antocianinas.....</b>	<b>7</b>
<b>3.4. Azúcares y ácidos orgánicos .....</b>	<b>7</b>
<b>3.5. Técnicas de extracción .....</b>	<b>8</b>
<b>3.5.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE).....</b>	<b>9</b>
<b>3.6. Técnicas de cuantificación de compuestos fenólicos .....</b>	<b>9</b>
<b>3.6.1. Espectroscopía de absorción UV-Vis.....</b>	<b>9</b>
<b>3.7. Técnicas de separación, cuantificación e identificación de antocianinas .....</b>	<b>10</b>
<b>3.7.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....</b>	<b>10</b>
<b>3.7.2. Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC).....</b>	<b>11</b>
<b>3.7.3. Espectrometría de masas (EM).....</b>	<b>11</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>5.1. Material biológico empleado.....</b>	<b>13</b>
<b>5.2. Disolventes y reactivos .....</b>	<b>13</b>
<b>5.3. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE) .....</b>	<b>14</b>
<b>5.3.1. Equipo de extracción .....</b>	<b>14</b>
<b>5.3.2. Procedimiento de extracción .....</b>	<b>15</b>

<b>5.4.</b>	<b>Espectroscopía UV-Vis.....</b>	<b>15</b>
5.4.1.	<i>Equipo UV-Vis.....</i>	<i>15</i>
5.4.2.	<i>Procedimiento de Folin-Ciocalteu.....</i>	<i>16</i>
<b>5.5.</b>	<b>Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a la espectroscopía UV-Vis (UHPLC-UV-Vis) .....</b>	<b>17</b>
5.5.1.	<i>Equipo de cromatografía.....</i>	<i>17</i>
5.5.2.	<i>Procedimiento de separación de antocianinas .....</i>	<i>17</i>
<b>5.6.</b>	<b>Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (UHPLC-Q-ToF-MS).....</b>	<b>19</b>
5.6.1.	<i>Equipo de separación e identificación .....</i>	<i>19</i>
5.6.2.	<i>Procedimiento de identificación .....</i>	<i>19</i>
<b>5.7.</b>	<b>Diseño de experimentos Box-Behnken (BBD) .....</b>	<b>20</b>
<b>5.8.</b>	<b>Optimización de múltiples respuestas y función deseabilidad .....</b>	<b>21</b>
<b>5.9.</b>	<b>Azúcares y ácidos orgánicos .....</b>	<b>22</b>
5.9.1.	<i>Equipos de separación e identificación .....</i>	<i>22</i>
5.9.2.	<i>Procedimiento de optimización.....</i>	<i>22</i>
5.9.3.	<i>Procedimiento de separación e identificación.....</i>	<i>23</i>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>6.1.</b>	<b>Extracción asistida por ultrasonidos (UAE) .....</b>	<b>25</b>
6.1.1.	<i>Optimización mediante diseño de experimentos .....</i>	<i>25</i>
6.1.2.	<i>Compuestos fenólicos totales .....</i>	<i>25</i>
6.1.2.1.	Condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales ...	25
6.1.2.2.	Estudio del tiempo de extracción .....	29
6.1.2.3.	Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia .....	30
6.1.3.	<i>Antocianinas totales.....</i>	<i>31</i>
6.1.3.1.	Condiciones óptimas para la extracción de antocianinas totales .....	31
6.1.3.2.	Estudio del tiempo de extracción .....	34
6.1.3.3.	Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia .....	35
6.1.4.	<i>Optimización de múltiples respuestas.....</i>	<i>35</i>
6.1.4.1.	Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia .....	37
<b>6.2.</b>	<b>Aplicación a muestras reales.....</b>	<b>38</b>
6.2.1.	<i>Compuestos fenólicos totales .....</i>	<i>38</i>



6.2.2.	<i>Antocianinas totales</i> .....	40
6.2.3.	<i>Estudio simultáneo de compuestos fenólicos y antocianinas totales</i> .....	41
6.3.	<i>Azúcares y ácidos orgánicos</i> .....	42
7.	CONCLUSIONES.....	44
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	45
9.	APÉNDICES.....	51

## 1. RESUMEN

La aronia negra (*Aronia melanocarpa*) es un arbusto de unos 0,5-3 m de altura, similar a las cerezas y originaria de América del Norte, aunque también se cultiva en Europa y Asia. La denominación que tiene en la actualidad de “superfruta” se debe a que cuenta con una gran cantidad de compuestos de interés biológico, concretamente compuestos fenólicos y antocianinas, superior al de otras frutas. Esto le proporciona a la aronia un elevado valor nutricional, debido a sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y anti-inflamatorias, lo que ha supuesto un aumento progresivo por el interés de esta fruta en los últimos años.

Como consecuencia de que este fruto ha comenzado a comercializarse recientemente, no existen descritas en la bibliografía técnicas de extracción y análisis exhaustivas específicamente desarrolladas para la aronia negra. En este trabajo, se ha desarrollado y optimizado el método de extracción asistida por ultrasonidos (UAE), tanto para la extracción por separado de compuestos fenólicos y antocianinas, así como para la extracción conjunta de ambos tipos de compuestos biológicos.

Para ello, se realizó un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken (BBD) con seis variables de estudio: 1) porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, 2) temperatura, 3) amplitud, 4) ciclo, 5) pH y 6) relación masa de muestra/volumen de disolvente (ratio). Las variables de respuestas fueron: 1) concentración de compuestos fenólicos totales y 2) antocianinas totales.

De cara a realizar la cuantificación de los compuestos fenólicos, se ha recurrido al procedimiento de Folin-Ciocalteu, que permite obtener la concentración total de los mismos haciendo uso de la espectroscopía UV-Vis. Por otra parte, para la identificación de las antocianinas se ha empleado un equipo de cromatografía de ultra-alta eficacia acoplado a la espectrometría de masas (UHPLC-Q-ToF-MS), mientras que para la separación y posterior cuantificación, se ha empleado un equipo de cromatografía líquida de ultra-alta eficacia, que cuenta con un detector UV-Vis, realizando la medición a 520 nm, que es el máximo de absorción de las antocianinas. Las antocianinas identificadas en la aronia negra han sido: cianidina-3-*O*-galactósido, cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-arabinósido y cianidina-3-*O*-xilósido.

Los factores más influyentes en las extracciones de compuestos fenólicos y antocianinas fueron el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción y la temperatura. Junto a ello, se realizó también un estudio del tiempo óptimo de extracción de estos compuestos biológicos (5 minutos para compuestos fenólicos totales y 15 minutos para antocianinas totales).

Seguidamente, se realizaron ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para los tres métodos de extracción desarrollados (compuestos fenólicos totales, antocianinas totales y extracción

conjunta de ambos), que permitieron apreciar su robustez y precisión, con coeficientes de variación inferiores al 5%.

Los tres métodos de extracción asistida por ultrasonidos, se aplicaron con éxito a muestras comerciales reales para valorar la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas totales en alimentos elaborados con aronia negra.

Finalmente, se estudiaron otros compuestos de interés biológico en la aronia negra como los azúcares y ácidos orgánicos. Los azúcares identificados fueron: sorbitol, glucosa, galactosa, fructosa y sacarosa. Los ácidos orgánicos identificados fueron: ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico y ácido láctico.

## 2. SUMMARY

Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) is a bush of about 0,5-3 meters high, similar to cherries and native to North America, although it's also grown in Europe and Asia. The name that currently has, "superfruit", is because of the large number of compounds of biological interest, specifically phenolic compounds and anthocyanins, higher than other fruits. These compounds provides chokeberry a high nutritional value due to its antioxidant, anticancer and anti-inflammatory properties which have led to a progressive increase in the interest of this fruit in recent years.

Due to this fruit has recently begun to be commercialized, extraction techniques and specific extraction analysis for chokeberry don't exist in the bibliography. In this work, ultrasound assisted extraction (UAE) has been developed and optimized, both to separate extraction of phenolic compounds and anthocyanins individually and to extract both types of biological compounds at the same time.

Therefore, a Box-Behnken experimental design (BBD) was carried out, using six variables: 1) percentage of methanol in the extraction solvent, 2) temperature, 3) amplitude, 4) cycle, 5) pH and 6) relationship between mass of sample/volume of solvent (ratio). Two responses variables were used: 1) concentration of total phenolic compounds and 2) total anthocyanins.

For the quantification of total phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu's procedure has been used, which allows the determination of the total concentration of these molecules by UV-Vis spectroscopy. On the other hand, for the identification of anthocyanins, an ultra-efficiency chromatography equipment coupled to a mass spectrometer (UHPLC-Q-ToF-MS) has been used while for separation and subsequent quantification, an ultra-high efficiency liquid chromatography equipment, with an UV-Vis detector, measuring at 520 nm, which is the maximum absorption of the anthocyanins, was used. The anthocyanins identified in chokeberry

were: cyanidin-3-*O*-galactoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-arabinoside and cyanidin-3-*O*-xyloside.

The most significant factors were the percentage of methanol in the extraction solvent and the temperature. Moreover, a study of the optimal extraction time of these biological compounds was also carried out (5 minutes for total phenolic compounds and 15 minutes for total anthocyanins).

Then, repeatability and intermediate precision tests were also carried out for the three extraction methods developed (total phenolic compounds, total anthocyanins and simultaneous extraction of both compounds), which allowed to appreciate their robustness and precision, with coefficients of variation less than 5%.

The three methods of ultrasound assisted extraction were successfully applied to real commercial samples for the analysis of the presence of phenolic compounds and total anthocyanins in foods made with chokeberry.

Finally, other compounds of biological interest in chokeberry were studied, such as sugars and organic acids. The sugars identified were: sorbitol, glucose, galactose, fructose and sucrose. The organic acids identified were: citric acid, malic acid, ascorbic acid and lactic acid.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Aspectos generales

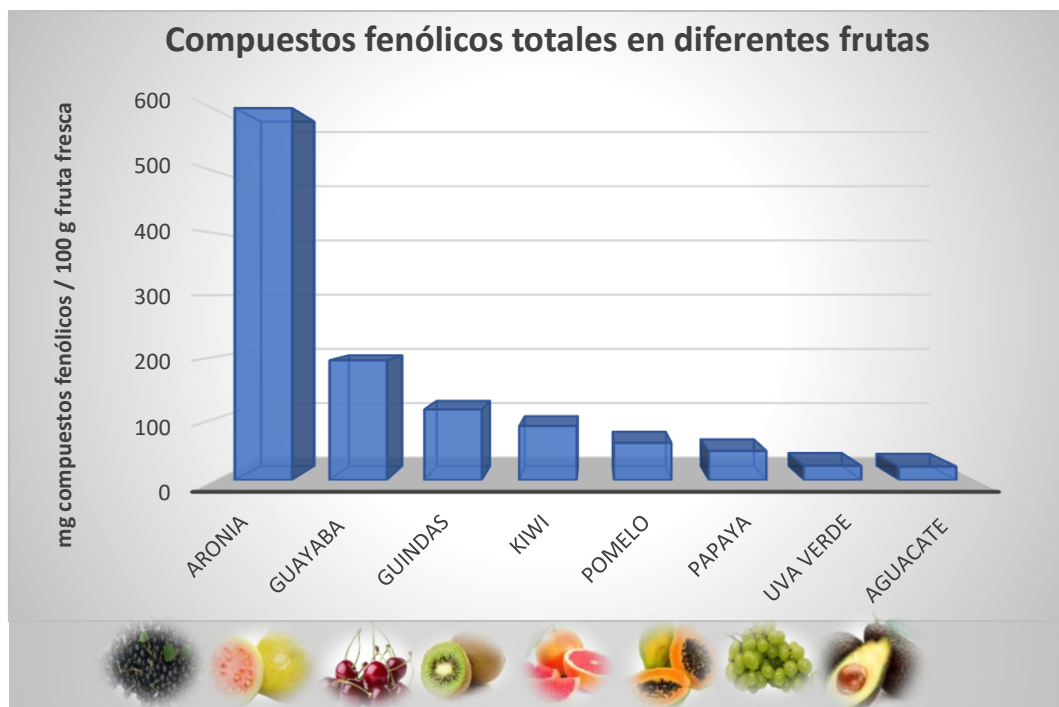
La aronia negra (*Aronia melanocarpa*) es un tipo de arbusto de 0,5-3 m de altura<sup>1</sup> originario de América del Norte, si bien es cierto que debido a sus beneficiosas propiedades, se ha producido un creciente interés por su cultivo en Europa, más en concreto en Europa del Este,<sup>2</sup> aunque también se cultiva en otros continentes como Asia.<sup>3</sup> La *Aronia melanocarpa* pertenece a la familia de las Rosáceas<sup>4</sup> y es la especie más conocida dentro del género *Aronia*, el cual, además de contar con la *Aronia melanocarpa* (negra), comprende la *Aronia arbutifolia* (roja) y una especie intermedia entre las dos anteriores, que es la *Aronia prunifolia* (púrpura).<sup>5</sup> Las bayas de aronia crecen en forma de racimos, son pequeñas, oscuras y similares a las cerezas<sup>6</sup> (Figura 1), cuyos frutos pueden comenzar a madurar a partir de mediados del mes de julio, aunque su tiempo óptimo de maduración son los meses de agosto y septiembre, momento más adecuado para conseguir una cosecha óptima, pues será en este tiempo, donde la aronia negra demostrará con mayor contundencia la carga tan beneficiosa que tiene para la salud.<sup>7</sup>



**Figura 1.** Aspecto de la aronia negra (*Aronia melanocarpa*)

El arbusto, cuyas hojas son de naturaleza caduca, crece en bosques húmedos y en pantanos,<sup>8</sup> prefiriendo aquellos lugares que presenten un carácter ligeramente ácido a nivel de pH. Los nativos americanos la usaban como alimento, sirviendo las infusiones para el tratamiento de resfriados, y la corteza se usaba como astringente.<sup>9</sup> Es conocida en la actualidad por la gran cantidad de propiedades beneficiosas que se le atribuyen, siendo una de las frutas que presenta un mayor contenido de compuestos de interés biológico, destacando los compuestos fenólicos en general, y las antocianinas en particular, que son la causa de su color tan intenso y de sus propiedades antioxidantes, además del sabor agrio y amargo que presentan,<sup>10</sup> lo que hace que rara vez se consuman de forma directa. Dicho contenido de compuestos fenólicos es mayor que el que pueden presentar otras frutas,<sup>11</sup> como la guayaba, guindas, kiwi, pomelo, papaya, uva verde o aguacate,<sup>12</sup> entre otros, tal y como puede comprobarse en la Figura 2. Por este motivo, se puede considerar a la aronia como una “superfruta” debido a su alto valor nutricional con efectos muy

beneficiosos para la salud, que radica en las propiedades antioxidantes,<sup>13</sup> anticancerígenas y anti-inflamatorias, ayudando incluso a la pérdida de peso corporal.



**Figura 2.** *Compuestos fenólicos totales en diferentes frutas, incluida Aronia melanocarpa*

### **3.2. Aplicaciones**

La significativa cantidad de aplicaciones que podemos señalar a nivel biológico respecto a la aronia negra como consecuencia de la gran cantidad de compuestos polifenólicos de los que dispone, especialmente antocianinas, proantocianidinas, flavonoles y ácidos fenólicos,<sup>14</sup> ha hecho que en los últimos años se haya producido un aumento considerable en el interés por esta fruta, ya que numerosos estudios demuestran su potencial como antioxidante, destacando el papel importante que tiene en la prevención de la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer de colon, así como efectos anti-inflamatorios, antimutagénicos, hepatoprotectores y cardioprotectores. Este hecho ha provocado un crecimiento de forma exponencial en la industria de productos elaborados con aronia: jarabes de fruta, jugos, mermeladas, jaleas, bebidas alcohólicas y no alcohólicas... Además de lo anterior, esta planta y sus extractos se están utilizando a menudo como conservantes de alimentos gracias a la inhibición de la peroxidación lipídica.<sup>15</sup>

### **3.3. Sustancias antioxidantes**

En nuestro cuerpo, como consecuencia del metabolismo celular, constantemente se están produciendo procesos de oxidación-reducción, es decir, una especie se oxidará, con la correspondiente pérdida de electrones, al mismo tiempo que otra especie se reducirá, con la aceptación de electrones. Como consecuencia de este proceso se generan lo que se conoce como

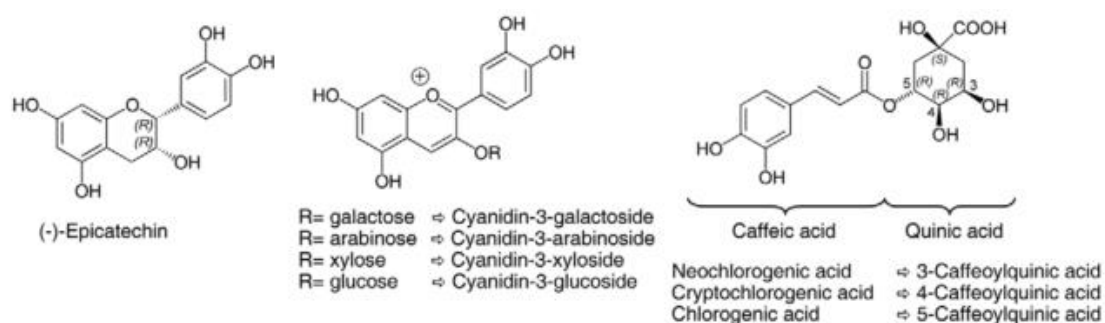
especies de oxígeno reactivo (ROS), es decir, radicales libres, que si se producen en cantidades elevadas conducen al estrés oxidativo, desencadenando patologías en la persona que experimenta dicha circunstancia y que puede acarrear diferentes problemas de salud, tales como Alzheimer o cáncer, entre otros. Para evitar esto, se hace necesaria la intervención de las sustancias antioxidantes, pues son las que permiten la eliminación de esas especies reactivas que inducen a la aparición del estrés oxidativo.<sup>16</sup> Por todo ello, en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los antioxidantes, de hecho, muchos componentes de nuestra dieta diaria tienen efecto antioxidante, tanto de forma directa como indirecta,<sup>17</sup> siendo las frutas y las verduras, las principales fuentes de antioxidantes en nuestra dieta, muy por encima de la que nos ofrecen otros alimentos, como algunos vegetales y especias.<sup>18</sup>

### 3.3.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos de naturaleza orgánica que se caracterizan por tener un anillo aromático que contará con uno o más sustituyentes hidroxilo, de ahí el nombre de fenol. Si el número de grupos -OH que hay sobre el anillo es mayor que 1 hablamos de polifenoles. Dichos compuestos son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas y se encuentran en gran cantidad de alimentos: frutas, verduras, cereales..., por lo que constantemente los incorporamos en nuestra dieta, algo que constituye la base de su importancia actual en el terreno de las enfermedades, tal y como ya se ha comentado.

Los principales grupos de compuestos fenólicos lo constituyen los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos, siendo el primero de ellos de gran importancia, ya que dentro del mismo se incluyen gran parte de los compuestos fenólicos con mayores propiedades biológicas como las antocianinas.<sup>19</sup>

La composición característica que presentan las bayas de aronia negra a nivel de compuestos fenólicos, es ampliamente conocida, tal y como refleja la bibliografía, conteniendo: procianidinas, antocianinas, flavonoles (quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-rutinósido), (-)-epicatequina, ácido clorogénico y ácido neoclorogénico).<sup>20</sup> Todo ello puede verse en la Figura 3.



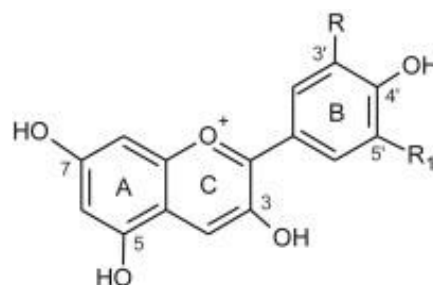
**Figura 3.** Compuestos fenólicos en *Aronia melanocarpa*

### 3.3.2. Antocianinas

Dentro de los diferentes tipos de compuestos fenólicos existentes se encuentran las antocianinas, que son flavonoides solubles en agua que otorgan el color azul, púrpura o rojo a muchas frutas y verduras. Respecto a su estructura, la cual se muestra en la Figura 4, se observa la presencia de una molécula de antocianidina, que recibe el nombre de aglicona, que se encuentra unida a un azúcar mediante un enlace glucosídico, que normalmente suele situarse en la posición 3 del anillo C, aunque también puede encontrarse en las posiciones 5 y 7 del anillo A, siendo esto menos frecuente. Los diferentes tipos de antocianinas se establecen en base al número de grupos hidroxilo que haya en la molécula, el grado de metilación de dichos grupos, el tipo, número y lugar de unión de las moléculas de azúcar, así como el tipo y número de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a los azúcares en una molécula de antocianina.<sup>21</sup> Estas diferencias se resumen en la tabla de la Figura 4.

ANTOCIANIDINA	R	R <sub>1</sub>
Cianidina*	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Pelargonidina	H	H
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

\*Antocianinas presentes en la aronia negra



**Figura 4.** Tipos de antocianinas según los radicales R y R<sub>1</sub> y estructura genérica de una antocianina

Debido a que la estabilidad que presentan este tipo de flavonoides es baja, se pueden degradar fácilmente. Factores como el pH, la concentración, la temperatura de almacenamiento o la luz, condicionan la estabilidad del color de las antocianinas.<sup>22</sup> Precisamente por el color es por lo que se usan mucho como colorante alimentario (conocidos como E163),<sup>23</sup> además del carácter anti-inflamatorio, anticancerígeno y antioxidante ya comentado. En el caso de la aronia negra, las antocianinas presentes en mayor medida son: cianidina-3-O-arabinósido, cianidina-3-O-galactósido, cianidina-3-O-glucósido y cianidina-3-O-xilósido.<sup>20</sup>

### 3.4. Azúcares y ácidos orgánicos

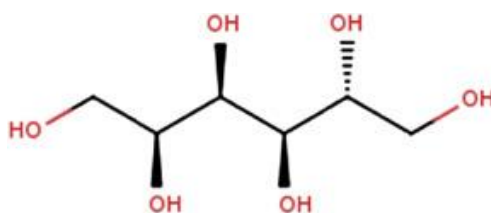
La bibliografía pone de manifiesto que la aronia es una fuente rica en ácidos orgánicos, tales como el ácido cítrico, el málico, el ascórbico y el láctico.<sup>24</sup> La importancia que presentan estos ácidos a nivel biológico es muy destacada, pues el ácido málico es el segundo acidificante más utilizado en la industria alimentaria y en las bebidas, sólo por detrás del ácido cítrico.<sup>25</sup>



El ácido ascórbico, también conocido como vitamina C, es soluble en agua y su deficiencia puede causar anemia, escorbuto, así como un debilitamiento del sistema inmunitario. La ingesta de este ácido depende de forma directa de fuentes dietéticas, ante la imposibilidad de sintetizarlo.<sup>26</sup>

En torno al 70% del ácido láctico producido es empleado en la alimentación, dado su determinante papel en la fabricación de yogures y quesos, que unido a su carácter emulsionante y de mejora de agentes en los productos alimenticios, justifican la importancia biológica de este ácido.<sup>27</sup>

Junto a ello, también son destacables los azúcares presentes en la aronia negra, donde, como mayoritarios, además de fructosa y glucosa, destaca el sorbitol<sup>24</sup> (Figura 5), que es un polialcohol de azúcar natural que se usa ampliamente como edulcorante y humectante, en la industria alimentaria (alimentos dietéticos) y farmacéutica.



*Figura 5. Estructura del sorbitol*

El contenido en azúcares y ácidos orgánicos de la aronia negra está fuertemente condicionado por las circunstancias en las que se produzca su maduración, si bien es cierto, que con independencia de este factor, la importancia del sorbitol está más que demostrada, pues el contenido de éste en la aronia negra es mayor en comparación con el que presentan otras bayas comerciales dulces, incluyendo las fresas, los arándanos, moras, grosellas y frambuesas, mientras que los niveles de acidez de la aronia no son significativamente diferentes al de otras bayas comerciales.<sup>28</sup>

### **3.5. Técnicas de extracción**

Como consecuencia de que este fruto ha comenzado a comercializarse recientemente, no existen en la bibliografía técnicas de extracción y análisis exhaustivas específicamente desarrolladas para la aronia negra. De cara a la determinación de compuestos con funciones biológicas, la extracción es un paso crucial, a nivel farmacéutico, alimentario, cosmético y de control de calidad del producto.<sup>29</sup>

La extracción es una técnica que implica el aislamiento del analito que nos interesa, separándolo de la matriz de la muestra, con el uso del correspondiente disolvente, teniendo en cuenta que, inicialmente, la mezcla de estudio puede estar en estado sólido o líquido y que, tras dicha técnica, se llevará a una fase líquida para el posterior proceso analítico.<sup>30</sup>

Entre los factores que condicionan una mayor o menor efectividad en la extracción, se encuentran el tipo y concentración del disolvente, la relación sólido-disolvente, el tiempo, la temperatura, el

pH,<sup>31</sup> etc.

Hay diferentes técnicas de extracción, desde las más convencionales como la percolación, maceración, extracción Soxhlet, hasta las más novedosas que acortan el tiempo de extracción, como la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), extracción mediante líquidos presurizados (PLE), extracción asistida por microondas (MAE) o extracción mediante fluidos supercríticos (SFE).<sup>32</sup>

### **3.5.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)**

Los ultrasonidos consisten en ondas de presión que se transmiten a través de un medio en forma de ciclos de compresión y expansión.<sup>33</sup> Como consecuencia de esos procesos de compresión y expansión, el líquido puede descomponerse y formar lo que se conoce como burbujas de cavitación, que colapsan durante un ciclo de compresión en el momento en el que las burbujas alcanzan un tamaño crítico, provocando la liberación de grandes cantidades de energía. Esto provoca que la reactividad química del medio se vea acelerada de forma considerable, mejora la penetración del disolvente y destruye las paredes celulares en matrices vegetales.<sup>34</sup> Uno de los factores que afecta al fenómeno de la cavitación es la temperatura, pues conforme mayor sea la temperatura, mayor será el tamaño y la duración de la burbuja formada.<sup>35</sup>

Las principales variables involucradas en la extracción asistida por ultrasonidos son: la materia prima (tipo, secado, tamaño de partícula), el extractante, la relación sólido-líquido, el dispositivo ultrasónico, el tiempo de ultrasonidos, la forma y tamaño del recipiente de extracción y la temperatura.<sup>33</sup> Esta técnica presenta muchas ventajas, ya que disminuye el tiempo de extracción y procesamiento, mejora el rendimiento de extracción, y además son fáciles de usar, flexibles, versátiles y de bajo costo,<sup>36</sup> como así se ha comprobado en su uso con el tomate,<sup>37</sup> uvas,<sup>38</sup> o las moras.<sup>39</sup>

## **3.6. Técnicas de cuantificación de compuestos fenólicos**

Una de las maneras más usuales para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales presentes en las matrices vegetales (extraídas previamente de la matriz) es mediante el uso de la espectroscopía de absorción UV-Vis.

### **3.6.1. Espectroscopía de absorción UV-Vis**

La espectroscopía UV-Vis es una técnica cuyo intervalo de acción va, principalmente, de 190 a 780 nm. El rango UV para esta técnica se encuentra entre los 190 y 380 nm y el intervalo visible va de los 380 a los 780 nm. Dado que la energía en este rango es mayor que en el IR, además de las transiciones vibracionales y rotacionales, hay transiciones electrónicas. Esta técnica es no destructiva, económica, con buena precisión, sensibilidad y requiere un tiempo breve de análisis.<sup>40</sup>

En la bibliografía, aparece el método de Folin-Ciocalteu, como uno de los métodos espectroscópicos más empleados para la determinación de compuestos fenólicos totales. Usa un reactivo, el reactivo de Folin-Ciocalteu, que consiste en una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, de color amarillo, generándose con esta mezcla iones de molibdeno y de tungsteno. Los iones de  $\text{Mo}^{6+}$ , se reducen a  $\text{Mo}^{5+}$ , en presencia de compuestos fenólicos, los cuales presentan un color azul, circunstancia que permite la cuantificación de estos compuestos, pudiéndose medir la absorbancia a 750 nm (máximo de absorción del complejo formado). Como patrón cuantitativo se suele emplear el ácido gálico.<sup>41</sup> Este método se ha aplicado con éxito a las fresas,<sup>42</sup> arándanos<sup>43</sup> o cerezas.<sup>44</sup>

### **3.7. Técnicas de separación, cuantificación e identificación de antocianinas**

En la bibliografía se observa que los métodos más usuales en la separación de antocianinas son los cromatográficos,<sup>31</sup> destacando la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), y recientemente la cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC), la cual supone un avance de la cromatografía HPLC.

#### **3.7.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

Es una técnica de separación instrumental en columna donde la fase móvil empleada es un líquido, mientras que las fases estacionarias más usuales son partículas pequeñas que se disponen en la columna y forman el empaque de la misma. Es reseñable el uso de altas presiones para superar la resistencia al flujo que realiza la columna al estar formada por este relleno de partículas. Conforme menor sea el tamaño de partícula, mayor será la eficacia de la columna y, por tanto, de la separación cromatográfica en su conjunto,<sup>45</sup> aunque se debería de trabajar en estos casos con presiones mayores.

Según la relación de polaridad entre la fase móvil y la fase estacionaria se puede distinguir:

- *Cromatografía en fase normal:* En ella, la fase estacionaria tiene un carácter polar frente a la naturaleza no polar de la fase móvil (hexano, acetato de etilo...). Por tanto, los componentes polares serán retenidos un mayor tiempo y los no polares se eluirán antes.
- *Cromatografía en fase inversa o reversa:* Aquí, la fase estacionaria es de naturaleza no polar, mientras que la fase móvil (agua, metanol, acetonitrilo...) tiene un carácter polar. Por tanto, los componentes no polares serán los que quedarán retenidos por mayor tiempo, mientras que los polares se eluyen antes.

Esta técnica (normalmente en fase inversa) ya se ha aplicado con éxito a la determinación de antocianinas en el caso de arándanos rojos,<sup>46</sup> moras negras,<sup>39</sup> vino tinto,<sup>47</sup> así como diferentes vegetales y productos comerciales procesados.<sup>48</sup>

### **3.7.2. Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC)**

Este tipo de cromatografía sólo es un avance de la cromatografía líquida de alta eficacia, anteriormente explicada, debido a los avances tecnológicos que se han ido experimentando en los últimos años y que ha permitido mejoras significativas en las fases estacionarias y en la instrumentación, posibilitando una mejor resolución, una buena selectividad, así como tiempos de análisis más cortos. Todo ello viene influenciado por la reducción del tamaño de partícula en comparación con el que tiene en HPLC, pues en este caso se establecen tamaños inferiores a 2  $\mu\text{m}$ , por lo que las presiones que se alcanzan son mayores a las que se establecen en HPLC.<sup>49</sup> En la bibliografía, se pueden encontrar muchas referencias a esta técnica con el objetivo de llevar a cabo la separación de antocianinas, tales como el caso de los zumos de fruta,<sup>50</sup> las zanahorias negras,<sup>51</sup> o en el açai y arándanos.<sup>52</sup>

Diversos tipos de detectores pueden acoplarse al HPLC, o lo que es lo mismo, al UHPLC, siendo de especial importancia el detector de matriz de diodos (DAD). Una de las razones que potencian el uso de este detector es su bajo costo,<sup>53</sup> así como su gran confiabilidad, eficacia de las fuentes de luz de las que dispone y el seguimiento simultáneo que se puede hacer de diferentes longitudes de onda.<sup>54</sup> Este detector ya ha sido usado por otros investigadores, que en su momento trabajaron con diferentes tipos de muestras: lentejas y garbanzos,<sup>55</sup> arándanos,<sup>56</sup> maqui,<sup>57</sup> uva roja,<sup>58</sup> entre otras.

### **3.7.3. Espectrometría de masas (EM)**

Es una técnica de elucidación estructural, que permite obtener información sobre la fórmula molecular de un compuesto, así como sus características estructurales gracias a una serie de fragmentos que se generan como consecuencia de la ionización del eluato que entra. Estos iones, generados a partir de la correspondiente fuente de iones, quedan separados por el espectrómetro de masas en función a su relación masa/carga, los cuales se ven sometidos a la acción de un campo magnético, que altera su trayectoria o incluso su velocidad, hasta que finalmente llegan al detector. Posteriormente, lo que se obtiene es un espectro de masas, en el que se representa la abundancia relativa de cada ion frente a la relación masa/carga, posibilitando de esta manera, la identificación de cada uno de los fragmentos generados.<sup>59</sup>

De forma general, la espectrometría de masas, va acoplada a otras técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases (CG) o la cromatografía líquida (U-HPLC), y nos ofrece buenos resultados a nivel de sensibilidad y especificidad<sup>60</sup> y es una herramienta fundamental en el control de calidad de los productos y, por ende, en la prevención de ciertos riesgos para la salud de las personas cuando ingerimos alimentos.<sup>61</sup> Esta técnica ha sido ya usada para la determinación de antocianinas y otros compuestos fenólicos en bayas de arándanos,<sup>62</sup> vino tinto<sup>63</sup> o uva,<sup>64</sup> entre otros.

#### 4. OBJETIVOS

La aronia negra (*Aronia melanocarpa*) es un arbusto cuyo fruto es conocido actualmente por la gran cantidad de propiedades beneficiosas con las que cuenta, pues presenta una cantidad de compuestos biológicos de interés superior al de otras especies. Este aspecto es el que dota a la aronia de un elevado valor nutricional, con marcados efectos anti-inflamatorios, antioxidantes, antimutagénicos y anticancerígenos, lo que le hace ser reconocida como una “superfruta”.

Como consecuencia de que este fruto ha comenzado a comercializarse recientemente, no existen en la bibliografía técnicas de extracción y análisis exhaustivas específicamente desarrolladas para la aronia negra. Debido a ello, este trabajo propone hallar las mejores condiciones posibles de cara a extraer la máxima cantidad de compuestos biológicos de interés en la aronia, para confirmar el carácter beneficioso de la misma. Por todo ello, los objetivos del trabajo son los siguientes:

- Desarrollo y optimización de un método de extracción de compuestos fenólicos totales y otro de antocianinas en la aronia negra, usando la extracción asistida por ultrasonidos. Los parámetros a considerar son: 1) porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, 2) la temperatura, 3) la amplitud, 4) el ciclo, 5) el pH, 6) el “ratio”, es decir, la relación masa de muestra/volumen de disolvente y 7) el tiempo de extracción.
- Desarrollo y optimización de un único método de extracción conjunto de compuestos fenólicos totales y antocianinas, usando la extracción asistida por ultrasonidos. Los parámetros a considerar son: 1) porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, 2) la temperatura, 3) la amplitud, 4) el ciclo, 5) el pH, 6) el “ratio”, es decir, la relación masa de muestra/volumen de disolvente y 7) el tiempo de extracción.
- Desarrollo y optimización de un método cromatográfico para la separación e identificación de las antocianinas presentes en la aronia negra mediante la cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC) con el uso de columnas de tipo Fused-Core.
- Estudio estadístico de la repetibilidad y precisión intermedia de los métodos desarrollados.
- Desarrollo y optimización de un método de extracción mediante ultrasonidos para conseguir la máxima extracción de azúcares y ácidos orgánicos presentes en la aronia negra, para lo que se tiene en cuenta los siguientes tres factores: 1) la temperatura, 2) el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción y 3) el tiempo.
- Estudio de la aplicabilidad de los métodos desarrollados en diferentes muestras comerciales que contengan aronia negra en su composición.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material biológico empleado

Para llevar a cabo los métodos de extracción, se han usado bayas de aronia crudas y deshidratadas, comercializadas en forma granular procedentes de la agricultura ecológica (NaturGreen, Librilla, Murcia, España) (Figura 6). Dado que la muestra se encontraba en forma de bayas y no totalmente seca, se realizó una liofilización previa. Con ello se facilitó la trituration de la muestra, mediante un molinillo eléctrico convencional (de manera suave para no aumentar en exceso la temperatura), con lo que se aumenta la superficie de contacto entre el fruto y el disolvente, haciendo más eficaz la extracción.



*Figura 6. Bayas de aronia*

Tras el desarrollo y optimización de los métodos de extracción asistida por ultrasonidos, se procedió a trabajar con muestras comerciales reales, las cuales quedan recogidas en la Tabla 1, para realizar el análisis y cuantificación de los compuestos biológicos de interés. Previamente al análisis, dichas muestras se conservaron en una cámara frigorífica a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Tabla 1. Muestras comerciales de aronia negra*

MUESTRAS ANALIZADAS	PREPARACIÓN
Aronia liofilizada en polvo “LYO”	No requiere ninguna preparación previa
Aronia cruda deshidratada “Salud Viva”	Trituración de los granos con un molinillo eléctrico hasta conseguir un polvo fino
Cápsulas de bayas de aronia “Vitalingo”	Apertura de las cápsulas para obtener el polvo que hay en su interior
Granos de bayas de aronia crudas deshidratadas “NaturGreen”	Liofilización y posterior trituración de los granos con un molinillo eléctrico hasta llegar a polvo fino
Zumo de aronia biológico “CebaNatural”	No requiere ninguna preparación previa
Vinagre de aronia orgánico “Veda Pleven”	No requiere ninguna preparación previa

### 5.2. Disolventes y reactivos

Para realizar las extracciones, se utilizaron mezclas de metanol y agua en diferentes proporciones (25 – 50 – 75%) y con diferentes valores de pH (2 – 4,5 – 7). El metanol usado (Fischer Scientific,

Loughborough, Reino Unido) fue de grado HPLC, mientras que el agua fue de calidad Milli-Q, la cual se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua Millipore (Bedford, Massachusetts, Estados Unidos). Los valores de pH de las diferentes mezclas se consiguieron adicionando hidróxido sódico 0,1 M y ácido clorhídrico 0,5 M hasta conseguir el pH deseado. El pH de los distintos disolventes se midió empleando un pH-metro (Crison, GLP 22, Barcelona, España).

De cara a realizar la cuantificación de compuestos fenólicos totales, se empleó agua destilada, reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato de sodio y fosfotungstato de sodio) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y carbonato de sodio anhidro (Panreac, Barcelona, España) y como patrón ácido gálico (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania).

En la separación cromatográfica de antocianinas se usó metanol, agua Milli-Q y ácido fórmico (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, Estados Unidos) de grado HPLC. Para la cuantificación de antocianinas, se usó cloruro de cianidina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, Estados Unidos) como patrón estándar.

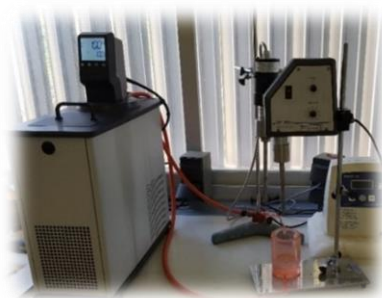
En el análisis de azúcares, se empleó una solución de hidróxido de sodio para cromatografía iónica (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, Estados Unidos) y acetato de sodio anhidro para biología molecular (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, Estados Unidos). Para los ácidos orgánicos, se hizo uso de acetona (VWR International, Radnor, Pensilvania, Estados Unidos) de grado HPLC y ácido sulfúrico concentrado para cromatografía iónica (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, Estados Unidos).

### **5.3. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)**

#### **5.3.1. Equipo de extracción**

La extracción asistida por ultrasonidos se llevó a cabo gracias al empleo de un equipo que consta de una Sonda UP 200 S (Ultraschallprozessor Dr. Hielscher, GmbH, Berlín, Alemania), con la que se controla el ciclo y la amplitud, siendo ambos parámetros variables en función al experimento a realizar. Esta sonda se encuentra acoplada a un baño termostático (VWR, Radnor, Pensilvania, Estados Unidos), que posibilita el control de la temperatura, factor que también se ve condicionado por el experimento.

La Figura 7 muestra el equipo al completo que se ha usado para realizar la extracción asistida por ultrasonidos, en la que se pueden diferenciar cada uno de los elementos especificados con anterioridad.



*Figura 7. Equipo utilizado para la extracción asistida por ultrasonidos*

### **5.3.2. Procedimiento de extracción**

Las variables a controlar en la extracción asistida por ultrasonidos fueron 6: porcentaje de metanol, temperatura, amplitud (porcentaje de potencia usada en relación a la máxima), ciclo (tiempo que se aplican las ondas de ultrasonidos por segundo), pH y ratio (relación masa de muestra/volumen de disolvente). Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- En primer lugar, se pesa, de forma aproximada, 0,5 gramos de la muestra liofilizada y triturada en un “Falcon” de 50 mL. Posteriormente, se le añade el volumen de disolvente necesario según el experimento y que viene determinado por la variable ratio.
- Seguidamente, se coloca el “Falcon” en el interior del vaso de doble pared, el cual se encuentra a la temperatura que marque el experimento, se introduce la sonda en el interior del “Falcon”, evitando que ésta contacte con las paredes y el fondo del mismo. Se selecciona la amplitud y el ciclo deseado, y se deja la extracción durante 10 minutos.
- Tras la extracción, el contenido del “Falcon” se centrifuga durante 5 minutos a 7500 rpm y a temperatura ambiente (unos 20 °C) para, posteriormente, trasvasar el sobrenadante a un matraz aforado de 25 mL, dejando parte del mismo sin trasvasar, de cara a volver a adicionarle el disolvente con el que se ha realizado la extracción y volver a extraer, con las mismas condiciones que antes. Luego, se vuelve a trasvasar el sobrenadante al matraz y se procede a realizar el enrase con el disolvente que proceda, según el experimento.
- Finalmente, se trasvasa el contenido del matraz aforado de 25 mL a un vial, el cual se conservará en una cámara frigorífica a -20 °C hasta su posterior análisis.

## **5.4. Espectroscopía UV-Vis**

### **5.4.1. Equipo UV-Vis**

Para conseguir la cuantificación de los compuestos fenólicos totales presentes en la aronia negra, se empleó un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Australia), que se



observa en la Figura 8.



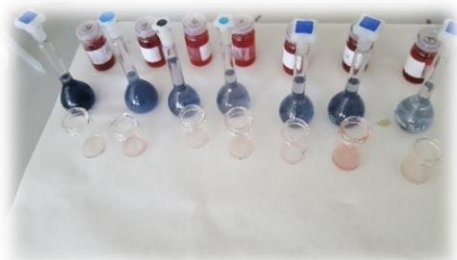
**Figura 8.** Espectrofotómetro UV-Vis usado

El espectrofotómetro cuenta con un intervalo de longitudes de onda que va de los 190 a los 1100 nm, con un ancho de banda espectral fijo de 1,5 nm. El equipo dispone además de una lámpara de xenón pulsante y detectores de diodos de Si. Las absorbancias se midieron usando cubetas de cuarzo.

#### **5.4.2. Procedimiento de Folin-Ciocalteu**

La reacción que tiene lugar entre los compuestos fenólicos presentes en nuestra muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu, conduce a la formación de un complejo de color azul, cuya intensidad depende de la mayor o menor proporción de compuestos fenólicos (Figura 9). Dicho complejo, absorbe a un máximo de 750 nm, y es precisamente en este punto, en el que la absorbancia se relacionará con la concentración de polifenoles, tal y como predice la ley de Lambert-Beer. El procedimiento seguido fue el siguiente:

En un matraz aforado de 25 mL, se depositaron 250  $\mu$ L de muestra, la cual se filtra con anterioridad en un filtro de jeringa de 0,45  $\mu$ m (RephiLe Bioscience, Ltd., Shanghai, China), 12,5 mL de agua destilada, 1,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 5 mL de carbonato de sodio al 20% y se enrasa el matraz con agua destilada. Todas las adiciones se realizan con las correspondientes micropipetas, seguido de una posterior agitación para homogeneizar. En la Figura 9 se muestra el resultado visual de los extractos y formación del complejo azul tras producirse la reacción mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu.



**Figura 9.** Extractos y formación del complejo azul tras producirse la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu

Debido a la cinética de la reacción, la medida de las absorbancias en el espectrofotómetro a 750 nm no se realizó de forma inmediata, sino que fue necesario esperar 30 minutos en oscuridad, ya que éste es el tiempo necesario para que los reactivos reaccionen entre sí y se forme el complejo azul. Previamente a esto, se realizó una recta de calibrado, usando el mismo procedimiento, pero con ácido gálico como patrón, preparando para ello patrones de concentración conocida entre 1 y 1000 ppm y se midieron sus valores de absorbancia. La recta de calibrado obtenida fue:  $y = 0,00099x + 0,06311$ . El  $R^2$  obtenido fue de 0,9999.

## **5.5. Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a la espectroscopía UV-Vis (UHPLC-UV-Vis)**

### **5.5.1. Equipo de cromatografía**

Las antocianinas presentes en la aronia negra se separaron y cuantificaron con la ayuda de un equipo de cromatografía Elite LaChrom Ultra System (VWR Hitachi, Tokyo, Japón), el cual está compuesto por un detector UV-Vis L-2420U, que se ajusta a 520 nm (máxima  $\lambda$  de absorción de antocianinas), un horno de columna L-2300 (trabajando a 50 °C), un automuestreador L-2200U y dos bombas L-2160U. Este equipo (Figura 10), puede alcanzar una presión máxima de 9000 psi y el volumen de inyección usado fue de 15  $\mu$ L.



**Figura 10.** *Equipo de cromatografía UHPLC empleado*

La columna que se utilizó fue una C-18 en fase reversa (Phenomenex Kinetex, CoreShell Technology, Torrance, California, Estados Unidos), de tipo Fused-Core de 100 x 2,1 mm, un tamaño de partículas de 2,6  $\mu$ m y un tamaño de poro de 100 Å.

### **5.5.2. Procedimiento de separación de antocianinas**

Los disolventes empleados para la separación cromatográfica de las antocianinas fueron dos: un disolvente A, consistente en agua Milli-Q acidificada al 5% con ácido fórmico; y un disolvente B, consistente en metanol puro, de grado HPLC. Los disolventes fueron desgasificados durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos (Elma S300 Elmasonic, Alemania) y, posteriormente, se filtraron con filtros de 0,22  $\mu$ m (RephiLe Bioscience, Ltd., Shanghái, China). Los extractos de aronia negra se filtraron con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu$ m antes de ser inyectados.

Lo primero que se realizó fue la optimización del método cromatográfico más conveniente de cara a conseguir la separación más efectiva de las antocianinas, con el objetivo de obtener un cromatograma con la mejor resolución posible. Para ello, se estudiaron previamente distintos gradientes de separación. Una vez elegido el gradiente óptimo se probaron distintos flujos y temperatura de columna, quedándonos finalmente con un flujo de 0,7 mL/min y una temperatura de columna de 50 °C. El gradiente usado se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Método en gradiente optimizado para la separación cromatográfica de antocianinas

Tiempo (min)	0	0,5	2	3,3	4,8	5,4	5,9	6,6	9,3	10	12
%B	15	25	25	30	40	55	60	95	95	15	15

La cuantificación de las antocianinas presentes en la aronia negra se realizó mediante una recta de calibrado usando como patrón de referencia cloruro de cianidina, para la cual se prepararon patrones con concentraciones entre 0,1 y 29 ppm. Considerando que todas las antocianinas presentes en la aronia negra tienen absorbancias similares a la cianidina y tomando el peso molecular de cada una de ellas, se elaboró una recta de calibrado para cada una de las cuatro antocianinas presentes en nuestra fruta. Los datos obtenidos, por orden de elución, se recogen en la Tabla 3, en el que además de la recta de calibrado, se muestra el coeficiente de regresión lineal obtenido ( $R^2$ ), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).

El límite de detección y cuantificación se calculan de la siguiente manera:

$$LOD = \frac{3 \cdot S_{blanco}}{m} \quad LOQ = \frac{10 \cdot S_{blanco}}{m}$$

$m$ : pendiente de la recta

$S$ : desviación estándar del blanco

**Tabla 3.** Rectas de calibrado, coeficientes de regresión lineal, límites de detección y cuantificación de las antocianinas presentes en la aronia

Compuesto	Recta de calibrado	$R^2$	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Cloruro de cianidina	$y = 262.231,56x - 2460,24$	0,9997	0,186	0,620
Cianidina-3- <i>O</i> -galactósido	$y = 188.308,61x - 2.460,24$	0,9997	0,259	0,863
Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	$y = 188.308,61x - 2.460,24$	0,9997	0,259	0,863
Cianidina-3- <i>O</i> -arabinósido	$y = 201.788,73x - 2.460,24$	0,9997	0,242	0,805
Cianidina-3- <i>O</i> -xilósido	$y = 201.788,73x - 2460,24$	0,9997	0,242	0,805

## **5.6. Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (UHPLC-Q-ToF-MS)**

### **5.6.1. Equipo de separación e identificación**

El equipo empleado para la identificación de las antocianinas presentes en la aronia negra fue un equipo de cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC) acoplado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo, mostrado en la Figura 11 (Xevo G2 QToF, Waters Corp., Milford, MA, Estados Unidos) el cual contiene un detector PDA, un automuestreador, una columna, así como administradores de disolventes cuaternarios y binarios. La separación cromatográfica se realizó en una columna analítica en fase reversa C18 (Acquity UPLC BEH C18, Waters), con unas dimensiones de 2,1 mm × 100 mm, con un tamaño de partícula de 1,7 µm.



**Figura 11.** Equipo UHPLC-Q-ToF-MS

### **5.6.2. Procedimiento de identificación**

Para la identificación de las antocianinas, fueron necesarios dos disolventes, A y B. Como disolvente A se usó agua de calidad Milli-Q acidificada con ácido fórmico al 2%, mientras que como disolvente B se trabajó con metanol puro. La velocidad de flujo fue de 0,4 mL/min. El gradiente utilizado se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Método en gradiente empleado para la identificación de antocianinas

Tiempo (min)	0	3,30	3,86	5,05	5,35	5,64	5,95	7,50
%B	15	20	30	40	55	60	95	95

El tiempo total de ejecución fue de 12 minutos, incluyendo 4 minutos de reequilibrio. Los análisis se llevaron a cabo mediante una fuente de electrospray operando en modo de ionización positiva en las siguientes condiciones: flujo de gas de desolvatación = 700 L/h, temperatura de desolvatación = 500 °C, flujo de gas de cono = 10 L/h, temperatura de la fuente = 150 °C, voltaje capilar = 700 V, voltaje de cono = 30 V y energía de colisión = 20 eV. Se usó el modo de exploración completa “Full Scan” en el intervalo (m/z = 100-1200).

En el espectro de masas se identificaron cuatro relaciones masa carga ( $m/z$ ) correspondientes a las antocianinas presentes en la aronia negra: cianidina-3-*O*-galactósido (449), cianidina-3-*O*-glucósido (449), cianidina-3-*O*-arabinósido (419) y cianidina-3-*O*-xilósido (419).

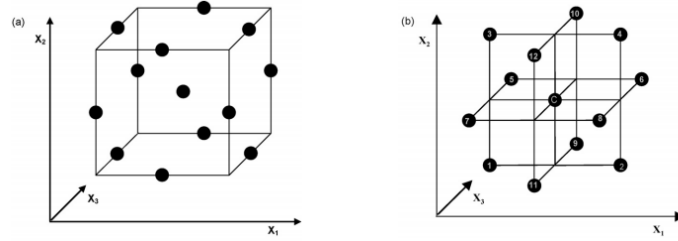
En el Apéndice 2 se muestra el cromatograma de las antocianinas presentes en la aronia negra y los espectros de masas característicos de cada una de ellas. En el cromatograma se observa que se produce la separación de las cuatro antocianinas presentes en la aronia negra en un tiempo inferior a 5 minutos.

### **5.7. Diseño de experimentos Box-Behnken (BBD)**

Para conocer cuáles eran las condiciones óptimas de extracción, así como saber qué factores tienen más relevancia en el proceso de extracción, incluyendo las interacciones entre los mismos, se empleó un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken (BBD), usando el programa estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVII.II (Warrenton, Virginia). BBD es un diseño de superficie de respuesta de segundo orden con el que se puede conseguir reducir el número de experimentos a realizar, con la consiguiente reducción de coste económico y de tiempo en comparación con la optimización de un único parámetro.<sup>65</sup>

En nuestro estudio de optimización se distinguen claramente dos tipos de variables: las variables independientes o factores, que en nuestro caso han sido 6 (porcentaje de metanol, temperatura, amplitud, ciclo, pH y “ratio”), y las variables dependientes o respuesta, que fueron la concentración de compuestos fenólicos y antocianinas totales (compuestos analizados cuantitativamente). Cada factor puede tomar tres posibles valores, los cuales quedan codificados como 0 y  $\pm 1$ , en función de si es el valor mínimo, intermedio o máximo, respectivamente. Esto hace que para UAE se tengan que realizar 54 experimentos. Los resultados del diseño BBD se muestra en la Tabla 20 del Apéndice 1.

El BBD evita la realización de experimentos en condiciones extremas, debido a que todos los puntos se encuentran a la misma distancia de un punto central, al mismo tiempo que posibilita la obtención de la máxima cantidad de información posible.<sup>65</sup> A modo de ejemplo, su representación para el caso de tres factores indicaría la realización de 13 experimentos y en él veríamos un cubo en el que todos los puntos se encuentran a la misma distancia de un punto central, con tres ejes, que mostrarían los valores máximo (+1), intermedio (0) y mínimo (-1) que pueden tomar cada uno de ellos (Figura 12).



**Figura 12.** Representación gráfica del diseño de Box-Behnken para tres factores

Los resultados se analizan por el modelo de superficie de respuesta, obteniéndose un modelo matemático en forma de una ecuación de segundo grado en el que se observa la respuesta del sistema en estudio en función de los factores e interacciones que intervengan en él y cuya forma general se expresa en la Ecuación 1.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

**Ecuación 1.** Polinomio general de segundo orden del diseño de Box-Behnken

En la ecuación anterior,  $y$  es la respuesta (compuestos fenólicos o antocianinas totales),  $\beta_i$  es el coeficiente para cada efecto principal,  $\beta_{ii}$  es el coeficiente de los factores cuadráticos,  $\beta_{ij}$  es el coeficiente de las interacciones entre  $i$  y  $j$ ,  $X$  hace referencia a cada uno de los factores y  $\varepsilon$  es el valor residual.

### **5.8. Optimización de múltiples respuestas y función deseabilidad**

Dado que a nivel de laboratorio o a nivel industrial se intenta minimizar en la medida de lo posible los costes y el tiempo de los análisis, es de vital importancia la optimización de múltiples respuestas, ya que con ello se reduce el número de experimentos a realizar. De esta forma, se obtienen las condiciones óptimas para una respuesta que contempla varios factores a la vez (compuestos fenólicos y antocianinas totales en nuestro caso), es decir, en lugar de aplicar condiciones individuales para cada una de las respuestas, se aplican unas condiciones conjuntas que optimicen ambas respuestas simultáneamente.

En este sentido, es conveniente resaltar el papel de la función de deseabilidad, que nos da una idea de cómo de aceptable es un experimento con varias respuestas. Esta función convierte las respuestas múltiples en una sola, la cual posteriormente, es optimizada. Inicialmente se crea una función de deseabilidad individual para cada una de las respuestas, “ $d$ ”, (compuestos fenólicos y antocianina totales), que toma valores entre 0 y 1, siendo 0 una respuesta indeseable, y 1 una respuesta deseable e ideal. Finalmente, se crea la función de deseabilidad global, “ $D$ ”, la cual es conveniente que tenga un valor diferente de 0, lo que significaría que todas las variables que se

optimizan simultáneamente tienen un valor deseable, a no ser que una de las respuestas tenga una “d” de 0, que conllevaría que “D” también fuese 0.<sup>66</sup>

## **5.9. Azúcares y ácidos orgánicos**

### **5.9.1. Equipos de separación e identificación**

Para el análisis de azúcares, se empleó un sistema de cromatografía iónica (Metrohm, 930 Compact IC Flex, Suiza), que contaba con un detector amperométrico y una columna Metrosep Carb 2 – 150 / 4.0 (Figura 13).



***Figura 13.** Equipo de azúcares usado*

De igual forma, para el análisis de los ácidos orgánicos presentes en la aronia negra, se empleó un sistema de cromatografía iónica (Metrohm, 930 Compact IC Flex, Suiza), el cual disponía de un detector conductimétrico y una columna Metrsep Organic Acids – columna 250 / 7.8. Dicho equipo se visualiza en la Figura 14.



***Figura 14.** Equipo de ácidos orgánicos usado*

### **5.9.2. Procedimiento de optimización**

De cara a conseguir la mayor extracción de azúcares y de ácidos orgánicos, previamente a la identificación y correspondiente cuantificación, se evaluó la influencia de una serie de factores que pueden afectar, de forma directa o indirecta, a la extracción de azúcares y ácidos orgánicos, tales como: 1) la temperatura (10 – 20 – 30 – 40 – 50 – 60 – 70 °C), 2) el porcentaje de metanol (0 – 10 – 20 – 40 – 60%) y 3) el tiempo (2 – 5 – 10 – 15 – 20 – 25 – 30 min).

Para ello, se realizaron diferentes extracciones asistidas por ultrasonidos en las que se iba variando el valor de cada uno de los factores a considerar, tomando un peso aproximado de 0,5 gramos de

muestra. Una vez realizada la extracción, el extracto era filtrado y enrasado en un matraz aforado de 25 mL.

Se llegó a la conclusión de que las mejores condiciones para conseguir la máxima extracción de azúcares y ácidos orgánicos eran las que se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones óptimas de extracción de azúcares y ácidos orgánicos

Temperatura (°C)	MeOH (%)	Tiempo (min)
50	0	5

A los extractos obtenidos de las muestras de alimentos analizadas en las condiciones óptimas de extracción (Tabla 5), se le aplicó una dilución de 1:10 para poder identificar y, posteriormente, cuantificar, tanto los azúcares como los ácidos orgánicos presentes en la aronia negra.

### 5.9.3. Procedimiento de separación e identificación

Para la separación de los azúcares se utilizó una mezcla de 300 mmol/L de hidróxido de sodio y 1 mmol/L de acetato de sodio como eluyente, a un flujo isocrático de 0,5 mL/min durante 20 minutos. Por otra parte, para la separación de los ácidos orgánicos el eluyente empleado fue una mezcla de 0,4 mmol/L de ácido sulfúrico y 12% de acetona, a un flujo isocrático de 0,4 mL/min durante 20 minutos.

La cuantificación de los azúcares y ácidos orgánicos presentes en la aronia negra pudo realizarse gracias a las rectas de calibrado de cada uno de los compuestos detectados, realizadas por el personal del Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas (CAIV) y que vienen recogidas en la Tabla 6 y Tabla 7, respectivamente.

**Tabla 6.** Rectas de calibrado y coeficientes de regresión lineal de los azúcares presentes en la aronia negra

Azúcar	Recta de calibrado	R <sup>2</sup>
Glucosa	$y = 1,12948x + 33,76830$	0,9992
Sorbitol	$y = 4,46476x - 10,08550$	0,9996
Fructosa	$y = 2,21664x + 36,87620$	0,9991
Inositol	$y = 4,38773x - 2,20668$	0,9999
Maltosa	$y = 1,24405x - 0,87104$	0,9996
Glicerol	$y = 4,56212x + 7,64606$	0,9999



**Tabla 7.** Rectas de calibrado y coeficientes de regresión lineal de los ácidos orgánicos presentes en la aronia negra

Ácido orgánico	Recta de calibrado	R <sup>2</sup>
Ácido ascórbico	$y = 2,05876 \cdot 10^{-4}x - 0,01992$	0,9996
Ácido málico	$y = 2,08510 \cdot 10^{-3}x + 0,07204$	0,9992
Ácido cítrico	$y = 1,99154 \cdot 10^{-3}x + 0,09397$	0,9997
Ácido láctico	$y = 1,08440 \cdot 10^{-3}x + 0,01757$	0,996

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

#### 6.1.1. Optimización mediante diseño de experimentos

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de la extracción asistida por ultrasonidos para determinar las condiciones óptimas de extracción para el caso de compuestos fenólicos y antocianinas totales en la aronia negra. Se empleó para ello un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken para obtener las condiciones óptimas de extracción, teniendo en cuenta seis variables independientes o factores (porcentaje de metanol, temperatura, amplitud, ciclo, pH y “ratio”) y dos variables dependientes o de respuesta (concentración de compuestos fenólicos totales por un lado y antocianinas totales por otro). Los rangos estudiados para cada una de las variables en UAE son los que se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Rango de las variables de estudio para las experiencias del diseño en UAE

FACTOR	VALORES	
	Compuestos fenólicos	Antocianinas
MeOH (%)	25 – 50 – 75	
Temperatura (°C)	10 – 40 – 70	
Amplitud (%)	30 – 50 – 70	
Ciclo	0,2 – 0,45 – 0,7	
pH	2 – 4,5 – 7	
Ratio (g:mL)*	0,5:10– 0,5:15 – 0,5:20	

\* Se considera "ratio" a la relación entre la masa de muestra tomada y el volumen de disolvente empleado. Para las distintas extracciones se ha tomado una masa fija de 0,5 gramos, variando únicamente el volumen de disolvente (10 – 15 – 20 mL)

En la Tabla 20 del Apéndice 1, se representan los 54 experimentos del diseño BBD realizado. Para cada uno de ellos, se pesó unos 0,5 gramos de aronia y se realizó la extracción empleando un tiempo de 10 minutos. Además, en dicha tabla se muestran los resultados obtenidos para compuestos fenólicos totales y antocianinas totales. Cada uno de los extractos obtenidos se analizó para determinar la concentración de ambos compuestos de interés biológico para así llegar a determinar las condiciones óptimas de extracción, tal y como se indica a continuación.

#### 6.1.2. Compuestos fenólicos totales

##### 6.1.2.1. Condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales

Para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales de los 54 extractos de aronia negra, se ha empleado el procedimiento de Folin-Ciocalteu, tal y como se ha comentado con anterioridad. Posteriormente, los resultados se han introducido en el programa estadístico

STATGRAPHICS CENTURION XVII.II, con el que se han obtenido las condiciones óptimas de extracción, así como qué factores e interacciones cuadráticas tienen una influencia destacada ( $p < 0,05$ ).

El análisis de la varianza (ANOVA) indica que el análisis explica el 80,80% de la variabilidad total, un resultado que, sin duda, es muy positivo, ya que algunos autores recomiendan obtener en análisis de este tipo un  $R^2$  superior al 80%. En la Tabla 9 se muestran los coeficientes estimados y el  $p$ -valor de cada una de las variables e interacciones entre las variables.

**Tabla 9.** Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden y  $p$ -valor para la cuantificación de compuestos fenólicos totales

EFFECTO	COEFICIENTE ESTIMADO	$p$ -VALOR
<b>MeOH</b>	<b>3,7671</b>	<b>0,0000</b>
<b>Temperatura</b>	<b>2,7221</b>	<b>0,0008</b>
<b>Amplitud</b>	<b>1,7705</b>	<b>0,0207</b>
Ciclo	0,7091	0,3328
pH	-1,0841	0,1434
Ratio	-0,0772	0,9153
<b>MeOH-MeOH</b>	<b>-6,2810</b>	<b>0,0000</b>
MeOH-Temperatura	-0,2556	0,8389
MeOH-Amplitud	-0,0607	0,9615
MeOH-Ciclo	-0,0741	0,9335
MeOH-pH	-1,5354	0,2283
MeOH-Ratio	0,9888	0,4340
Temperatura-Temperatura	1,4981	0,1839
Temperatura-Amplitud	0,9282	0,4624
Temperatura-Ciclo	-0,7275	0,5638
Temperatura-pH	0,4708	0,5972
Temperatura-Ratio	1,3344	0,2934
<b>Amplitud-Amplitud</b>	<b>2,7683</b>	<b>0,0181</b>
Amplitud-Ciclo	0,8617	0,4948
Amplitud-pH	1,1837	0,3502
Amplitud-Ratio	-0,4697	0,5980
Ciclo-Ciclo	1,7305	0,1269
Ciclo-pH	-0,6086	0,6288

Ciclo-Ratio	1,0368	0,4123
pH-pH	-1,8673	0,1008
pH-Ratio	-1,7954	0,1610
Ratio-Ratio	-1,6375	0,1477

*En negrita se marcan los efectos influyentes en la extracción de compuestos fenólicos totales*

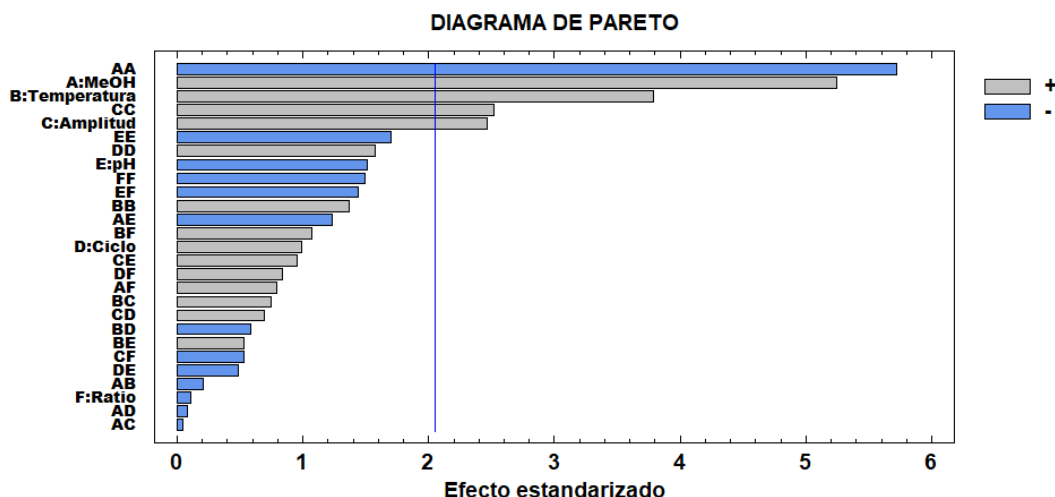
Los efectos más influyentes para la extracción de compuestos fenólicos son los que presentan un *p*-valor inferior a 0,05 para un nivel de significación del 95%. Concretamente, el porcentaje de MeOH, la temperatura, la amplitud y las interacciones cuadráticas MeOH-MeOH y amplitud-amplitud son los efectos más influyentes y, con los que se ha trabajado para obtener la ecuación polinómica de segundo orden reducida (Ecuación 2) que da resultados similares a los obtenidos con la ecuación completa.

$$\text{Cantidad de compuestos fenólicos totales} = 24,7014 + 3,7671 \cdot \text{MeOH} + 2,7221 \cdot \text{Temperatura} + 1,7705 \cdot \text{Amplitud} - 6,2810 \cdot \text{MeOH}^2 + 2,768 \cdot \text{Amplitud}^2$$

***Ecuación 2.** Ecuación polinómica de Box-Behnken de segundo orden reducida para compuestos fenólicos totales*

- Diagrama de Pareto

Para ver de una forma más visual los efectos e interacciones más significativas sobre la variable respuesta a un nivel de confianza del 95%, se representa el diagrama de Pareto (Figura 15).



***Figura 15.** Diagrama de Pareto para compuestos fenólicos totales*

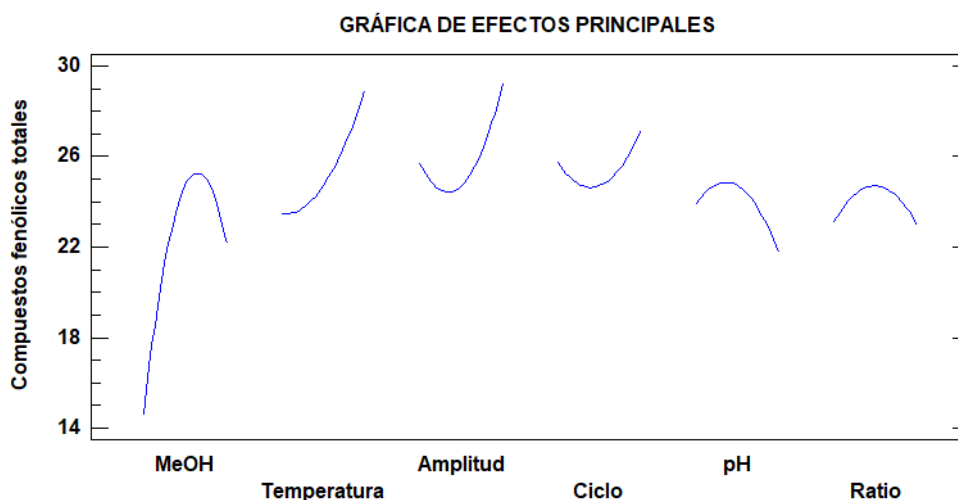
Aquellas variables que tengan un efecto estandarizado superior a un valor de 2,06 se consideran que tienen una influencia significativa sobre la variable respuesta (compuestos fenólicos totales). De igual forma, es necesario saber el significado de los signos positivo y negativo que aparecen en la Figura 15. El signo +, indica una relación directa entre la variable y/o interacción estudiada,

y la variable respuesta, mientras que el signo –, indica una relación inversa.

Teniendo todo esto en cuenta, se observa cómo el porcentaje de metanol, la temperatura y la amplitud, presentan un efecto significativo y positivo sobre la variable respuesta. La interacción cuadrática MeOH-MeOH es la más significativa de todas, con un efecto negativo.

- Gráfica de efectos principales

A través de la gráfica de efectos principales, mostrada en la Figura 16, se puede ver en qué medida la variable respuesta se ve condicionada por cada uno de los factores estudiados al aplicar la extracción asistida por ultrasonidos. La mayor o menor pendiente nos indicará de forma cualitativa la mayor o menor influencia de los efectos. Además, las pendientes pueden ser crecientes (influencia positiva) o decrecientes (influencia negativa).



**Figura 16.** Gráfica de efectos principales para compuestos fenólicos totales

Como se ha visto anteriormente en el diagrama de Pareto, el porcentaje de MeOH, la temperatura y la amplitud son los factores con una mayor influencia sobre la variable respuesta, si bien es cierto que la pendiente de la temperatura y amplitud son menos pronunciadas que la del MeOH, por lo que sus efectos son ligeramente más discretos.

- ✓ La pendiente del factor MeOH es creciente, hasta que llega a un máximo, a partir del cual decrece. Ese máximo se alcanza, aproximadamente superada la mitad del intervalo (que va desde –1 hasta +1), lo que confirma el hecho de que el valor óptimo sea del 58%. Este valor vendrá determinado por la similitud de polaridad entre el disolvente de extracción y los compuestos fenólicos presentes en la aronia negra.
- ✓ La temperatura tiene un efecto positivo, ya que su pendiente es creciente, alcanzándose el máximo al final del intervalo, pero es importante tener en cuenta que no es adecuado aplicar una temperatura mayor debido a la cercanía del punto de ebullición de la mezcla metanol:agua en los rangos estudiados, además de poder provocar la degradación y

fragmentación de los compuestos fenólicos presentes en la muestra.

- ✓ La amplitud tiene un efecto poco notorio sobre la variable respuesta, observándose cómo la pendiente inicialmente es decreciente y luego va aumentando progresivamente, por lo que es conveniente usar valores altos de amplitud, aunque no es un factor determinante.

Finalmente, tras un estudio y tratamiento de los datos, se llegaron a las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales en UAE, que quedan recogidas en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales

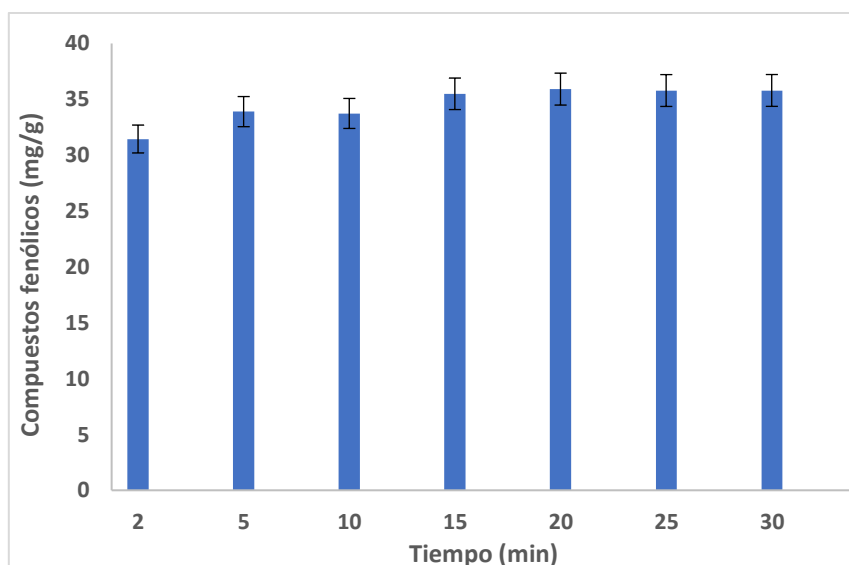
Compuestos fenólicos (UAE)	
Factor	Valor óptimo
MeOH (%)	58
Temperatura (°C)	70
Amplitud (%)	70
Ciclo	0,7
pH	3,87
Ratio (g:mL)	0,5:17

Para el porcentaje de metanol, se obtiene un valor intermedio dentro del intervalo estudiado, como consecuencia de la polaridad de los compuestos fenólicos que hay en la aronia, sin embargo, para la temperatura se obtiene el extremo superior del intervalo como valor óptimo, teniendo siempre presente que no se podría emplear una temperatura superior a los 70 °C, de cara a evitar la ebullición de la mezcla.

El resto de factores no tienen un efecto significativo, sin embargo, según los valores de pH a los que se ha trabajado (2 – 4,5 – 7), no es recomendable el uso de disolventes a un pH inferior a 2, ya que podría ocurrir la hidrólisis ácida de los compuestos fenólicos.

#### **6.1.2.2. Estudio del tiempo de extracción**

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos totales, se realizó un ensayo para determinar el tiempo óptimo de extracción, realizando para ello diferentes extracciones (por duplicado) con tiempos entre 2 y 30 minutos (Figura 17).



**Figura 17.** Concentración de compuestos fenólicos totales frente al tiempo

La Figura 17 pone de manifiesto que el tiempo óptimo de extracción de compuestos fenólicos totales en UAE es de 5 minutos, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre este tiempo y tiempos superiores

#### 6.1.2.3. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Bajo las condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos, se procedió a la realización de los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia empleando 5 minutos. Para la repetibilidad, se realizaron 12 extracciones en un mismo día, mientras que para la precisión intermedia, se llevaron a cabo 12 extracciones diarias durante tres días consecutivos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para compuestos fenólicos totales

	Repetibilidad	Precisión intermedia
Media (mg/g)	35,152	35,628
Desviación estándar (mg/g)	1,209	1,418
Coefficiente de variación (%)	3,44	3,98

A la vista de los resultados, se puede decir que el método que se ha desarrollado y optimizado es bastante preciso, pues los valores del coeficiente de variación no exceden, en ninguno de los casos, el 5% que es el límite que se suele contemplar en este tipo de ensayos para considerar que un método sea o no preciso.

### 6.1.3. Antocianinas totales

#### 6.1.3.1. Condiciones óptimas para la extracción de antocianinas totales

Tras estudiar las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales, se realizó un tratamiento estadístico similar para las antocianinas totales presentes en la aronia negra. Los 54 extractos se analizaron mediante cromatografía líquida UHPLC. Posteriormente, tras aplicar el diseño de experimento de superficie de respuesta de Box-Behnken se han podido determinar las condiciones óptimas de extracción, así como qué factores e interacciones cuadráticas tienen una influencia destacada.

El análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados indica que el análisis explica el 93,78% de la variabilidad total, un resultado superior al obtenido para los compuestos fenólicos totales, lo que pone de manifiesto que el análisis de las antocianinas totales, permite la obtención de resultados más próximos a la realidad. En la Tabla 12 se muestran los coeficientes estimados y el *p*-valor de cada una de las variables e interacciones entre las mismas.

*Tabla 12. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden y p-valor para la cuantificación de antocianinas totales*

EFEECTO	COEFICIENTE ESTIMADO	<i>p</i> -VALOR
MeOH	-0,0371	0,0000
Temperatura	0,0331	0,0000
Amplitud	0,0152	0,0009
Ciclo	0,0223	0,0000
pH	-0,0121	0,0061
Ratio	-0,0075	0,0772
MeOH-MeOH	-0,0616	0,0000
MeOH-Temperatura	-0,0167	0,0249
MeOH-Amplitud	-0,0076	0,2888
MeOH-Ciclo	-0,0074	0,1475
MeOH-pH	-0,0046	0,5212
MeOH-Ratio	0,0111	0,1259
Temperatura-Temperatura	0,0194	0,0043
Temperatura-Amplitud	-0,0041	0,5650
Temperatura-Ciclo	-0,0046	0,5194
Temperatura-pH	0,0067	0,1867
Temperatura-Ratio	0,0083	0,2474



Amplitud-Amplitud	0,0070	0,2717
Amplitud-Ciclo	0,0119	0,1016
Amplitud-pH	-0,0010	0,8824
Amplitud-Ratio	-0,0094	0,0695
Ciclo-Ciclo	-0,0010	0,8736
Ciclo-pH	-0,0062	0,3880
Ciclo-Ratio	0,0050	0,4810
pH-pH	0,0001	0,9900
pH-Ratio	0,0025	0,7230
Ratio-Ratio	-0,0036	0,5613

*En negrita se marcan los efectos influyentes en la extracción de antocianinas totales.*

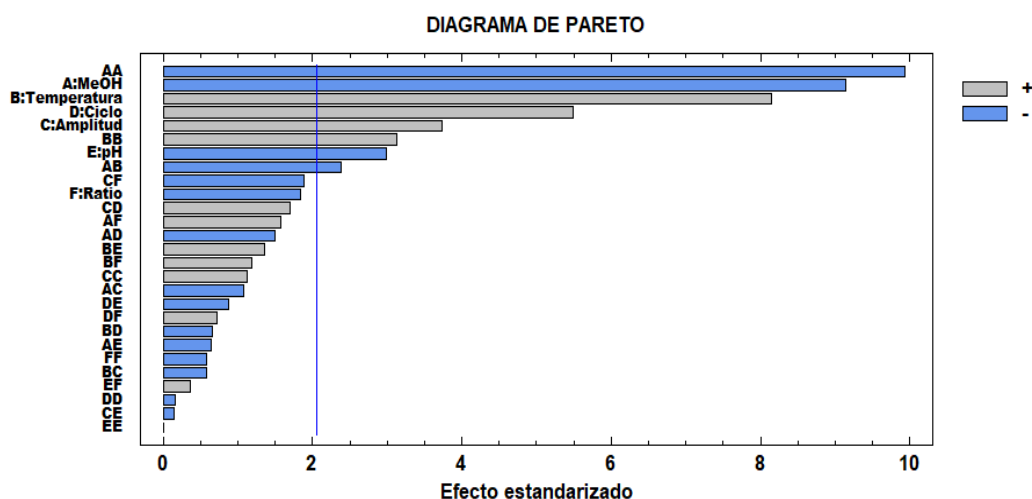
Los efectos más influyentes para la extracción de antocianinas son los que presentan un *p*-valor inferior a 0,05 para un nivel de significación del 95%. Concretamente, el porcentaje de MeOH, la temperatura, la amplitud (al igual que para los compuestos fenólicos), además del ciclo, pH, así como las interacciones cuadráticas MeOH-MeOH, MeOH-temperatura y temperatura-temperatura. Dichos efectos e interacciones son los que se muestran en la ecuación polinómica de segundo orden reducida (Ecuación 3).

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de antocianinas totales} = & 0,1941 - 0,0371 \cdot \text{MeOH} + 0,0331 \cdot \text{Temperatura} \\ & + 0,0152 \cdot \text{Amplitud} + 0,0223 \cdot \text{Ciclo} - 0,0121 \cdot \text{pH} - 0,0616 \cdot \text{MeOH}^2 \\ & - 0,0167 \cdot \text{MeOH} \cdot \text{Temperatura} + 0,0194 \cdot \text{Temperatura}^2 \end{aligned}$$

**Ecuación 3.** Ecuación polinómica de Box-Behnken de segundo orden reducida para antocianinas totales

- Diagrama de Pareto

En línea con lo comentado anteriormente, en el siguiente diagrama de Pareto (Figura 18) se aprecian los efectos e interacciones más significativas sobre la variable respuesta (cantidad de antocianinas totales) a un nivel de confianza del 95%, donde aquellas variables que tengan un efecto estandarizado superior a 2,06 tendrán una influencia significativa sobre la variable respuesta.

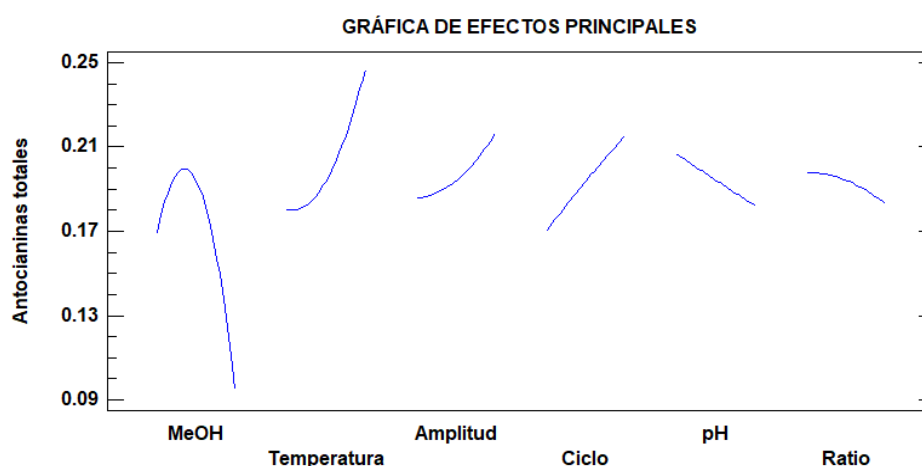


**Figura 18.** Diagrama de Pareto para antocianinas totales

El porcentaje de MeOH, la temperatura, el ciclo, la amplitud y el pH, son los factores más influyentes sobre la variable respuesta, presentando un efecto positivo, excepto el porcentaje de MeOH y el pH, que tienen un efecto negativo sobre la variable respuesta. De todos ellos, el porcentaje de MeOH y la temperatura tienen una influencia destacada en comparación con el resto de factores. La interacción cuadrática MeOH-MeOH es la más significativa de todas, presentando un efecto negativo. Otras interacciones como la temperatura-temperatura (efecto positivo) y MeOH-temperatura (efecto negativo) son significativas, aunque su importancia estadística es prácticamente nula en comparación con la interacción MeOH-MeOH.

- Gráfica de efectos principales

En la Figura 19, se muestra la gráfica de efectos principales. Se puede apreciar la gran influencia que tienen el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción y la temperatura, como se ha comentado con anterioridad. De igual forma, se confirma la poca significación de la amplitud, el ciclo, el “ratio” y el pH en contraste con los dos factores anteriores.



**Figura 19.** Gráfica de efectos principales para antocianinas totales

- ✓ La pendiente del factor MeOH es, casi en su totalidad, decreciente (influencia negativa), alcanzando un máximo un poco más allá del mínimo, es decir, ligeramente superior al 25%, que es el porcentaje de MeOH más bajo que se ha estudiado.
- ✓ La temperatura tiene un efecto positivo, tal y como ocurría con los compuestos fenólicos totales ya que su pendiente es creciente, alcanzándose el máximo al final del intervalo. Cabe recordar que no es adecuado trabajar por encima de los 70 °C, para evitar la ebullición de la mezcla de disolventes y la posible degradación de las antocianinas.<sup>67</sup>
- ✓ La amplitud y el ciclo tienen un efecto positivo pero muy poco significativo, por tanto, conviene el uso de los máximos valores de ambos. Por el contrario, el pH, tiene un efecto negativo, por lo que interesa el uso del menor pH posible, es decir, 2, pero tampoco es un factor crucial en la extracción de antocianinas.

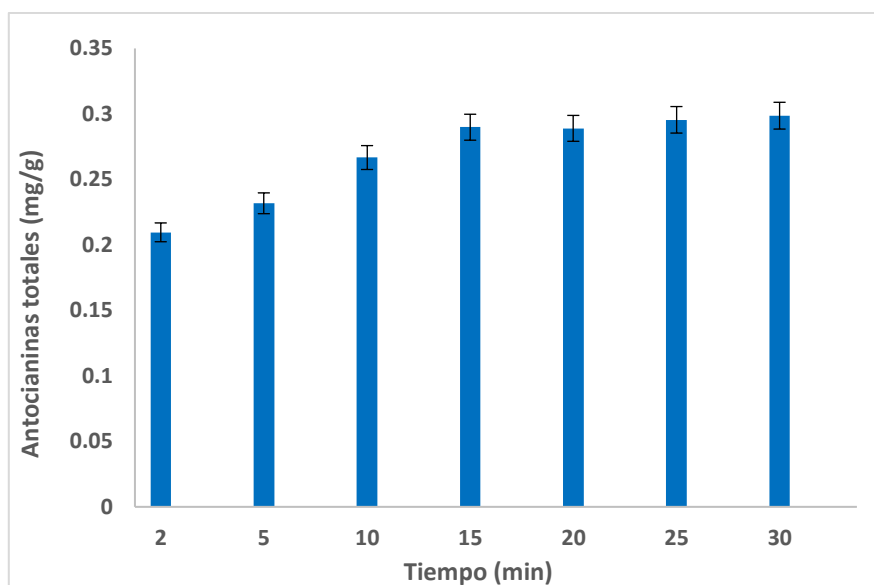
En la Tabla 13 se recogen las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas totales en UAE.

**Tabla 13.** Condiciones óptimas para la extracción de antocianinas totales

Antocianinas (UAE)	
Factor	Valor óptimo
MeOH (%)	34
Temperatura (°C)	70
Amplitud (%)	70
Ciclo	0,7
pH	2
Ratio (g:mL)	0,5:13,5

#### 6.1.3.2. Estudio del tiempo de extracción

Después de obtener las condiciones óptimas de extracción de antocianinas totales, se realizó un ensayo cuyo objetivo fue estudiar el tiempo óptimo de extracción, realizando para ello diferentes extracciones (por duplicado) con tiempos entre 2 y 30 minutos (Figura 20).



**Figura 20.** Concentración de antocianinas totales frente al tiempo

Lo que se deduce de la gráfica anterior es que a partir de los 15 minutos no hay diferencias estadísticamente significativas en la extracción de antocianinas, por lo que éste sería el tiempo óptimo de extracción.

#### 6.1.3.3. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

De igual forma a como se hizo con los compuestos fenólicos totales, se procedió para realizar el estudio de la repetibilidad y precisión intermedia del método optimizado para la extracción de antocianinas totales. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos:

**Tabla 14.** Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para antocianinas totales

	Repetibilidad	Precisión intermedia
Media (mg/g)	0,287	0,293
Desviación estándar (mg/g)	0,009	0,010
Coeficiente de variación (%)	3,12	3,42

Para el caso de las antocianinas totales, se observa que el método optimizado es algo más preciso que el que depara los compuestos fenólicos, volviéndonos a situar en valores de coeficiente de variación inferiores al 5%.

#### 6.1.4. Optimización de múltiples respuestas

Hasta el momento, se han hallado las condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos y antocianinas totales de forma individual. Dado que a nivel industrial tienen una gran importancia factores como el tiempo y los costes, se hace necesario buscar unas condiciones óptimas simultáneas de compromiso para extraer la mayor cantidad posible de compuestos

fenólicos y antocianinas totales de forma conjunta. Tal y como se recoge en la Tabla 21 del Apéndice 3, el experimento 28 presenta una deseabilidad máxima de 1, lo cual indica que la respuesta que se obtiene (extracción máxima simultánea de compuestos fenólicos y antocianinas totales) es deseable e ideal. Tras hacer el correspondiente tratamiento estadístico, se llegó a las condiciones óptimas para maximizar la extracción simultánea de compuestos fenólicos y antocianinas totales, que se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15.** *Condiciones óptimas simultáneas para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales*

<b>Compuestos fenólicos y antocianinas (UAE)</b>	
<b>Factor</b>	<b>Valor óptimo</b>
MeOH (%)	54
Temperatura (°C)	69,4
Amplitud (%)	70
Ciclo	0,7
pH	2,72
Ratio (g:mL)	0,5:6,6

A modo de resumen, y para ver la idoneidad de la aplicación de estas condiciones, se muestra en la Tabla 16 una comparativa de las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales de forma individual, y conjunta. Además, en esta tabla se observa la máxima cantidad teórica de compuestos fenólicos y antocianinas que se puede extraer mediante los dos tipos de optimización.

**Tabla 16.** *Comparativa de las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales mediante UAE usando la optimización simple y la múltiple*

<b>Factor</b>	<b>Compuestos fenólicos totales</b>	<b>Antocianinas totales</b>	<b>Compuestos fenólicos totales + Antocianinas totales</b>
<b>MeOH (%)</b>	58	34	54
<b>Temperatura (°C)</b>	70	70	69,4
<b>Amplitud (%)</b>	70	70	70
<b>Ciclo</b>	0,7	0,7	0,7
<b>pH</b>	3,87	2	2,72
<b>Ratio (mL)</b>	0,5:17	0,5:13,5	0,5:6,6
<b>Cantidad óptima extraída teórica (mg/g)</b>	38,159	0,325	37,823 + 0,283

Al realizar la optimización de múltiples respuestas, se observa que la concentración de compuestos fenólicos y antocianinas totales que es posible extraer a nivel teórico es ligeramente inferior a la que se obtiene en la optimización simple, sin observarse diferencias significativas, por lo que la aplicación de unas condiciones conjuntas en lugar de dos condiciones de extracción por separado para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas, puede permitir un ahorro en tiempos y costes a nivel industrial.

Respecto a los factores a controlar para llevar a cabo la máxima extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales de forma conjunta, resaltar que el porcentaje de MeOH es más próximo al que se usó para los compuestos fenólicos que para las antocianinas, mientras que la temperatura, amplitud y ciclo, toman exactamente los mismos valores que para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas por separado.

Finalmente, el valor de pH para la optimización múltiple es un valor intermedio a los obtenidos en las optimizaciones simples de los compuestos fenólicos y antocianinas totales, mientras que el volumen de disolvente es bastante inferior al que hay que emplear si hiciésemos las extracciones de los compuestos biológicos de interés mencionados por separado, lo que pone de manifiesto el ahorro que se produciría en la industria respecto a los reactivos a emplear.

#### 6.1.4.1. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Al igual que se hicieron ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales por separado, tras llegar a las condiciones óptimas simultáneas, se procedió de la misma manera, llegando a los resultados mostrados en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para compuestos fenólicos antocianinas totales de forma conjunta

	Repetibilidad		Precisión intermedia	
	Compuestos fenólicos	Antocianinas	Compuestos fenólicos	Antocianinas
Media (mg/g)	33,762	0,270	33,315	0,273
Desviación estándar (mg/g)	1,404	0,009	1,456	0,010
Coefficiente de variación (%)	4,16	3,20	4,37	3,73

En línea con lo que ocurría para el método de extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales por separado, el método conjunto para ambos tipos de compuestos biológicos resulta ser bastante preciso, pues el coeficiente de variación no excede en ninguno de los casos el 5%, que se considera el límite a partir del cual, un método no sería considerado preciso.

## 6.2. Aplicación a muestras reales

Después de haber obtenido las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales, así como las condiciones conjuntas para ambos compuestos biológicos, se han aplicado esas tres condiciones de extracción a varias muestras comerciales elaboradas a partir de la aronia negra. Éstas fueron mencionadas en la Tabla 1 y se muestran en la Figura 21.

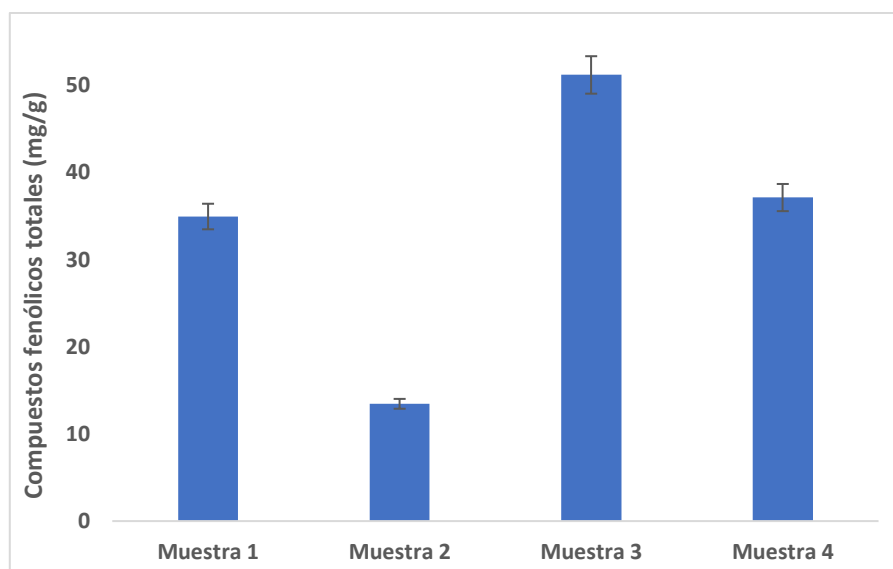


*Figura 21. Muestras comerciales elaboradas a partir de la aronia negra*

### 6.2.1. Compuestos fenólicos totales

De las 6 muestras reales, debido a que el vinagre y el zumo de aronia se encuentran en estado líquido, no tuvieron que ser extraídas, lo que explica que el número total de extracciones realizado fuese de 12 (4 muestras sólidas por triplicado).

Las muestras sólidas se extrajeron empleando la extracción asistida por ultrasonidos bajo las condiciones óptimas obtenidas para la extracción de compuestos fenólicos totales (Tabla 10). Los extractos obtenidos se analizaron mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu, ya explicado en apartados anteriores. La Figura 22 recoge, a través de un gráfico de barras, los resultados obtenidos para todas las muestras sólidas analizadas. El motivo por el que en este gráfico no se incluyen el zumo y el vinagre de aronia negra, que se corresponden con las muestras 5 y 6, respectivamente, es debido a la naturaleza líquida de las mismas, lo que implica que requieren un tratamiento algo diferente con respecto a las sólidas.



**Figura 22.** *Compuestos fenólicos extraídos en muestras reales sólidas elaboradas con aronia negra*

Como se puede apreciar en la Figura 22, la muestra 3 es la que presenta un mayor número de compuestos fenólicos, que se corresponde concretamente con las cápsulas de bayas de aronia “Vitalingo”, y que supera los 50 mg/g.

Cabe destacar que la concentración de compuestos fenólicos totales en las muestras 1 y 4 es similar, correspondiendo ambas a muestras liofilizadas. La muestra 1, de la marca “LYO”, se trata de aronia en polvo que ya viene liofilizada comercialmente, mientras que la muestra 4 son los granos de aronia “NaturGreen” con los que se trabajó para el diseño de experimentos y que, previamente a su uso, tuvieron que ser liofilizados.

Sin necesidad de aplicar las condiciones de extracción optimizadas dada su naturaleza inicial líquida, se analizó la cantidad de compuestos fenólicos totales en las muestras 5 y 6, que se corresponden con el zumo y el vinagre, respectivamente. Para el zumo se obtuvo una concentración de compuestos fenólicos totales de 826,30 mg/L, mientras que para el vinagre fue de 558,94 mg/L.

Dada la comercialización en forma líquida que se hace de estas muestras, la cantidad de compuestos fenólicos totales de ambas se expresa en mg/L y no en mg/g como se hacía anteriormente, ya que en este caso, no se ha hecho ninguna pesada, sino que directamente se cogió del bote comercial una alícuota para realizar la medición, lo que explica el análisis independiente que se hace de éstas. A la vista de los resultados, la muestra 5, es decir, el zumo de aronia, presenta una mayor cantidad de compuestos fenólicos que el vinagre, existiendo entre ambas una diferencia de más de 250 mg/L.

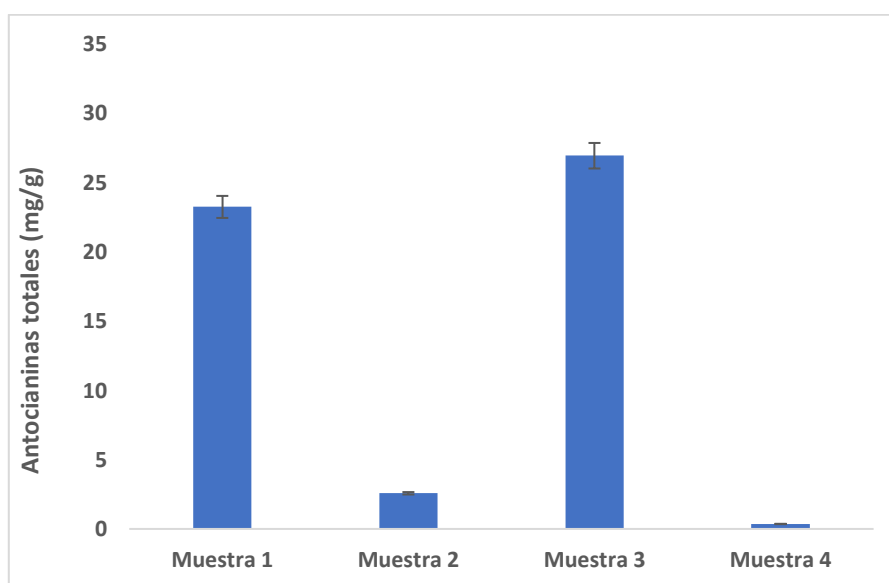
En la Tabla 22 del Apéndice 4 aparecen las cuantificaciones exactas de los compuestos fenólicos



totales en cada una de las muestras comerciales sólidas de aronia negra.

### 6.2.2. Antocianinas totales

Al igual que se hizo con los compuestos fenólicos, se realizaron un total de 12 extracciones (4 muestras por triplicado) en las condiciones óptimas obtenidas para las antocianinas totales (Tabla 13) mediante la aplicación de la extracción asistida por ultrasonidos, haciendo uso del método correspondiente de separación de antocianinas, mostrado en la Tabla 2. Los resultados obtenidos a nivel de cuantificación de antocianinas totales para las muestras sólidas aparecen en la Figura 23.



**Figura 23.** Antocianinas extraídas en muestras reales sólidas elaboradas con aronia negra

Cabe destacar la baja presencia de antocianinas en la muestra 4, que es aquella con la que se ha realizado el diseño de experimentos, es decir, las bayas de aronia que fueron sometidas a una liofilización previa a su uso. Esto puede ser debido a que esta muestra procedía de bayas de aronia secas, pudiéndose haber producido la degradación de gran parte de las antocianinas en este proceso.

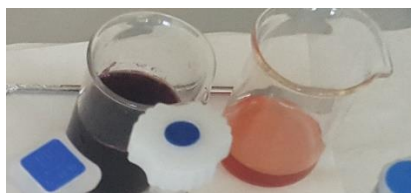
Al igual que ocurría con los compuestos fenólicos totales, se vuelve a ver como la muestra 1, de la marca “LYO”, que ya venía liofilizada comercialmente, y la muestra 3 (las cápsulas) son las que demuestran su mayor potencial como antioxidantes, con unas cuantificaciones que superan los 23 y 25 mg/g, respectivamente.

En la Tabla 22 del Apéndice 4 aparecen las cuantificaciones exactas de las antocianinas totales en cada una de las muestras comerciales sólidas de aronia negra.

Las muestras 5 y 6, ambas líquidas, vuelven a ser tratadas de forma independiente, ya que no se ha realizado una extracción de las mismas. La concentración de antocianinas totales obtenida para

el zumo fue de 374,88 mg/L, mientras que para el vinagre fue de tan sólo 2,03 mg/L.

La muestra 6 es el vinagre y, prácticamente, no presenta antocianinas. Esto se debe al proceso de fermentación que ha dado como resultado la elaboración de este vinagre. Dicho proceso, que es realizado a unos 30 °C y en condiciones fuertemente aeróbicas durante un periodo superior de 24 horas favorece la degradación de las antocianinas, de hecho, el color rojo del vinagre no es tan intenso como el que puede presentar el zumo o cualquiera de las otras muestras sólidas con las que se ha trabajado, como se puede apreciar en la Figura 24. Este hecho se observa también en otras muestras, como el vinagre del vino u otras frutas como la fresa.<sup>68</sup>



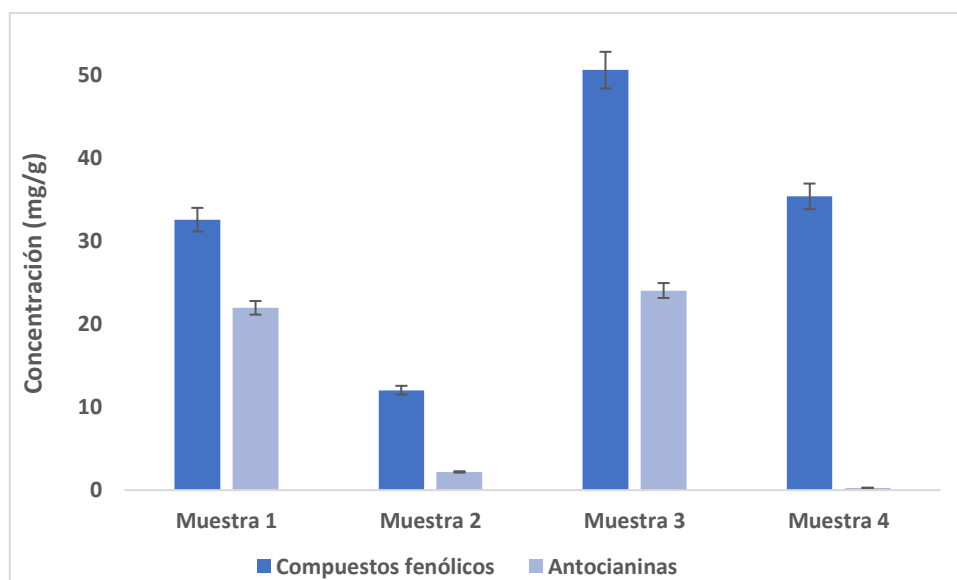
**Figura 24.** Comparación tonalidad del zumo de aronia (izquierda) y vinagre de aronia (derecha)

Contrariamente a lo ocurrido con el vinagre, la muestra número 5, es decir, el zumo de aronia presenta una gran cantidad de antocianinas, superando los 350 mg/L. Nuevamente, el zumo de aronia vuelve a demostrar su mayor potencial como antioxidante con respecto al vinagre, al igual que sucedía con los compuestos fenólicos totales.

### **6.2.3. Estudio simultáneo de compuestos fenólicos y antocianinas totales**

Aplicando las condiciones óptimas simultáneas para maximizar la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas (Tabla 15), se volvieron a realizar 12 extracciones asistidas por ultrasonidos (4 muestras por triplicado) para, posteriormente, realizar el procedimiento de Folin-Ciocalteu (compuestos fenólicos totales), así como la cromatografía líquida (cuantificación de las antocianinas).

En la Figura 25 se observan los niveles de cuantificación de compuestos fenólicos y antocianinas de las muestras sólidas aplicando estas condiciones simultáneas.



**Figura 25.** *Compuestos fenólicos y antocianinas extraídos en muestras reales sólidas elaboradas con aronia negra aplicando las condiciones simultáneas de extracción*

Lo que se observa en la Figura 25 es que los resultados, a nivel de compuestos fenólicos y antocianinas totales, presentan valores similares a los obtenidos cuando se aplican las condiciones individuales de los dos tipos de compuestos biológicos, lo que potencia la idoneidad de este tipo de condiciones, con el objetivo de ahorrar tiempo y costes.

En el caso de las muestras 2 y 4, que corresponden a bayas de aronia negra secas, se observa que proporcionalmente hay una concentración mucho más pequeña de antocianinas que de compuestos fenólicos. Esto nos indica la existencia de degradación de antocianinas en el secado de la muestra, tal como se comentó en el capítulo anterior.

En el caso de las antocianinas, la tendencia es muy similar a la observada cuando se aplicaban las condiciones óptimas simples (Tabla 13), destacando la gran cantidad de antocianinas en las muestras 1 (liofilizada), 3 (cápsulas) y 4 (bayas del diseño de experimentos), con valores que superan los 30 mg/g en todos los casos. La muestra 2, que son bayas de aronia, es la que presenta una menor concentración de estos compuestos.

En la Tabla 23 del Apéndice 4 aparecen las cuantificaciones exactas de los compuestos fenólicos y antocianinas totales en cada una de las muestras comerciales sólidas de aronia negra a través de la aplicación de las condiciones conjuntas de extracción.

### **6.3. Azúcares y ácidos orgánicos**

Aplicando las condiciones óptimas que se obtuvieron (Tabla 5) para conseguir la mejor extracción de azúcares y ácidos orgánicos, se pudo valorar a nivel cuantitativo la presencia de los mismos en la aronia negra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18 (azúcares) y en la Tabla 19

(ácidos orgánicos).

**Tabla 18.** Cuantificación de los azúcares individuales y totales presentes en la aronia negra

	Glucosa	Sorbitol	Fructosa	Inositol	Maltosa	Glicerol	TOTAL
mg/g	207,9280	118,9995	92,8570	0,6837	0,4955	0,0983	<b>421,0621</b>

La glucosa, el sorbitol y la fructosa son los azúcares mayoritarios en la aronia negra, mientras que el inositol, la maltosa y el glicerol también han sido detectados pero su presencia es prácticamente despreciable en comparación a los tres mayoritarios. La glucosa, el sorbitol y la fructosa constituyen el 99,70% de la totalidad de azúcares que contiene la aronia.

**Tabla 19.** Cuantificación de los ácidos orgánicos individuales y totales presentes en la aronia negra

	Ácido ascórbico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido láctico*	TOTAL
mg/g	97,4975	12,6956	4,8495	-	<b>115,0427</b>

*\*El ácido láctico fue detectado pero no pudo ser cuantificado por encontrarse por debajo del límite de cuantificación*

El ácido ascórbico es el mayoritario en la aronia negra, constituyendo el 85% de la composición a nivel de ácidos orgánicos que presenta esta fruta. La presencia del ácido málico es 8 veces inferior al del ascórbico y el del cítrico de 24 veces inferior. Es reseñable la detección que se ha hecho del ácido láctico, el cual no ha podido ser cuantificado por quedar por debajo del límite de cuantificación.

## 7. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Los métodos de extracción asistida por ultrasonidos desarrollados para compuestos fenólicos totales y antocianinas totales resultan ser adecuados para la extracción en la aronia negra (*Aronia melanocarpa*).
- El método de extracción asistida por ultrasonidos desarrollado y optimizado para la extracción conjunta de compuestos fenólicos y antocianinas totales presentes en la aronia negra, ha resultado adecuado, ya que no presenta diferencias significativas con respecto a los métodos desarrollados para estos compuestos individualmente. Esto aporta beneficios a nivel industrial, llegando de esta manera a un importante ahorro de tiempo y también de costes.
- El método de cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC) desarrollado resulta ser adecuado para la separación, identificación y cuantificación de las diferentes antocianinas que presenta la aronia negra (*Aronia melanocarpa*), separando estos compuestos en un tiempo inferior a 5 minutos.
- Los métodos de extracción asistida por ultrasonidos para compuestos fenólicos y antocianinas totales, así como el método de extracción conjunto para ambos compuestos, han presentado una alta repetibilidad y precisión intermedia, ya que en ninguno de los tres casos, se obtiene un coeficiente de variación que exceda el límite del 5%, por lo que pueden considerarse métodos que presentan bastante precisión.
- El método de extracción conjunto para azúcares y ácidos orgánicos, es adecuado, lo que facilita su separación, identificación y cuantificación, permitiendo ver la riqueza en azúcares y ácidos orgánicos de la aronia negra.
- Se ha demostrado la aplicabilidad de los métodos desarrollados para la cuantificación de compuestos fenólicos y antocianinas totales (por separado y conjuntamente) a muestras comerciales que contienen aronia negra.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Jeppsson, N. The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking'. *Sci. Hortic.* **83**, 127–137 (2000).
2. Valcheva-Kuzmanova, S., Kuzmanov, A., Kuzmanova, V. & Tzaneva, M. *Aronia melanocarpa* fruit juice ameliorates the symptoms of inflammatory bowel disease in TNBS-induced colitis in rats. *Food Chem. Toxicol.* **113**, 33–39 (2018).
3. Szopa, A., Starzec, A. & Ekiert, H. The importance of monochromatic lights in the production of phenolic acids and flavonoids in shoot cultures of *Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia* and *Aronia × prunifolia*. (2018). *J. Photoch. & Photob.* **179**, 91-97 (2018)
4. Wu, T. *et al.* *Aronia* (*Aronia melanocarpa*) phenolics bioavailability in a combined in vitro digestion/Caco-2 cell model is structure and colon region dependent. *J. Funct. Foods* **38**, 128–139 (2017).
5. Tolić, M. T. *et al.* Effects of Weather Conditions on Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Juice of Chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish J. Food Nutr. Sci.* **67**, 67-74 (2017).
6. Case, A. J., Agraz, D., Ahmad, I. M. & Zimmerman, M. C. Low-Dose *Aronia melanocarpa* Concentrate Attenuates Paraquat-Induced Neurotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–11 (2016).
7. Jurikova, T. *et al.* Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules* **22**, 944 (2017).
8. Lee, J. E. *et al.* Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food Chem.* **146**, 1–5 (2014).
9. Benatrehina, P. A., Pan, L., Naman, C. B., Li, J. & Kinghorn, A. D. Usage, biological activity, and safety of selected botanical dietary supplements consumed in the United States. *J. Tradit. Complement. Med.* **8**, 267–277 (2018).
10. Oszmiański, J. & Lachowicz, S. Effect of the Production of Dried Fruits and Juice from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the Content and Antioxidative Activity of Bioactive Compounds. *Molecules* **21**, 1098 (2016).
11. Phanie Dudonné, S. *et al.* Comprehensive analysis of phenolic compounds and abscisic

- acid profiles of twelve native Canadian berries. *J. Food Comp. and Anal.* **44**, 214-224 (2015).
12. Fu, L. *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chem.* **129**, 345–350 (2011).
  13. Felzenszwalb, I., da Costa Marques, M. R., Mazzei, J. L. & Aiub, C. A. F. Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: A potential superfruit to be considered. *Food Chem. Toxicol.* **58**, 536–544 (2013).
  14. Jakobek, L., Drenjančević, M., Jukić, V. & Seruga, M. Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of ‘Nero’, ‘Viking’, ‘Galicianka’ and wild chokeberries. *Sci. Hortic.* **147**, 56–63 (2012).
  15. Cvetanović, A. *et al.* Chemical and biological insights on aronia stems extracts obtained by different extraction techniques: From wastes to functional products. *J. Supercrit. Fluids* **128**, 173–181 (2017).
  16. Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P. & Anuradha, G. Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pac. J. Trop. Med.* **10**, 1111-1116 (2017).
  17. Kumar, S., Krishna Chaitanya, R. & Preedy, V. R. Assessment of Antioxidant Potential of Dietary Components. in *HIV/AIDS* 239–253 (Elsevier, 2018).
  18. Nowak, D., Gośliński, M. & Wojtowicz, E. Comparative Analysis of the Antioxidant Capacity of Selected Fruit Juices and Nectars: Chokeberry Juice as a Rich Source of Polyphenols. *Int. J. Food Prop.* **19**, 1317–1324 (2016).
  19. Xu, C.-C., Wang, B., Pu, Y.-Q., Tao, J.-S. & Zhang, T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin. J. Nat. Med.* **15**, 721–731 (2017).
  20. Kulling, S. & Rawel, H. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Med.* **74**, 1625–1634 (2008).
  21. Veberic, R., Slatnar, A., Bizjak, J., Stampar, F. & Mikulic-Petkovsek, M. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Sci. Technol.* **60**, 509–517 (2015).
  22. Hellström, J., Mattila, P. & Karjalainen, R. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *J. Food Compos. Anal.* **31**, 12–19 (2013).
  23. Cretu, G. C. & Morlock, G. E. Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by

- planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chem.* **146**, 104–112 (2014).
24. Sójka, M., Kołodziejczyk, K. & Milala, J. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Ind. Crops Prod.* **51**, 77–86 (2013).
  25. Naude, A. & Nicol, W. Malic acid production through the whole-cell hydration of fumaric acid with immobilised *Rhizopus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* **137**, 152–161 (2018).
  26. Singh, P. & Prasad, S. Determination of ascorbic acid and its influence on the bioavailability of iron, zinc and calcium in Fijian food samples. *Microchem. J.* **139**, 119–124 (2018).
  27. Eş, I. *et al.* Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Res. Int.* **107**, 763–770 (2018).
  28. Bolling, B. W. *et al.* Harvest date affects aronia juice polyphenols, sugars, and antioxidant activity, but not anthocyanin stability. *Food Chem.* **187**, 189–196 (2015).
  29. Čujić, N. *et al.* Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem.* **194**, 135–142 (2016).
  30. Belwal, T. *et al.* A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends Anal. Chem.* **100**, 82–102 (2018).
  31. Albuquerque, T. G., Silva, M. A., Oliveira, M. B. P. P. & Costa, H. S. Analysis, Identification, and Quantification of Anthocyanins in Fruit Juices. in *Fruit Juices* 693–737 (Elsevier, 2018).
  32. Castro-López, C. *et al.* Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chem.* **237**, 1139–1148 (2017).
  33. Lavilla, I. & Bendicho, C. Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. in *Water Extraction of Bioactive Compounds* 291–316 (Elsevier, 2017).
  34. Cravotto, G. & Binello, A. Low-Frequency, High-Power Ultrasound-Assisted Food Component Extraction. in *Innovative Food Processing Technologies* 3–29 (Elsevier, 2016).
  35. Rodrigues, S. & Fernandes, F. A. N. Extraction Processes Assisted by Ultrasound. in *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation* 351–368 (Elsevier, 2017).



36. Rutkowska, M., Namieśnik, J. & Konieczka, P. Ultrasound-Assisted Extraction. in *The Application of Green Solvents in Separation Processes* 301–324 (Elsevier, 2017).
37. Lianfu, Z. & Zelong, L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason. Sonochem.* **15**, 731–737 (2008).
38. Cho, Y.-J., Hong, J.-Y., Chun, H. S., Lee, S. K. & Min, H.-Y. Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *J. Food Eng.* **77**, 725–730 (2006).
39. Espada-Bellido, E. *et al.* Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chem.* **219**, 23–32 (2017).
40. Boffito, D. C. *et al.* Spectroscopy. in *Experimental Methods and Instrumentation for Chemical Engineers* 339–383 (Elsevier, 2018).
41. Chen, L.-Y., Cheng, C.-W. & Liang, J.-Y. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem.* **170**, 10–15 (2015).
42. Lester, G. E., Lewers, K. S., Medina, M. B. & Saftner, R. A. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *J. Food Compos. Anal.* **27**, 102–107 (2012).
43. Orellana-Palma, P., Petzold, G., Guerra-Valle, M. & Astudillo-Lagos, M. Impact of block cryoconcentration on polyphenol retention in blueberry juice. *Food Biosci.* **20**, 149–158 (2017).
44. Mirto, A. *et al.* Metabolic characterization and antioxidant activity in sweet cherry (*Prunus avium* L.) Campania accessions: Metabolic characterization of sweet cherry accessions. *Food Chem.* **240**, 559–566 (2018).
45. Moldoveanu, S. C., David, V., Moldoveanu, S. C. & David, V. General Aspects Regarding the HPLC Analytical Column. in *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis* 231–277 (Elsevier, 2017).
46. Šmídová, B., Šatínský, D., Dostálová, K. & Solich, P. The pentafluorophenyl stationary phase shows a unique separation efficiency for performing fast chromatography determination of highbush blueberry anthocyanins. *Talanta* **166**, 249–254 (2017).
47. de Villiers, A., Cabooter, D., Lynen, F., Desmet, G. & Sandra, P. High-efficiency high performance liquid chromatographic analysis of red wine anthocyanins. *J. Chromatogr. A*

- 1218**, 4660–4670 (2011).
48. Can, N. O., Arli, G. & Atkosar, Z. Rapid determination of free anthocyanins in foodstuffs using high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **130**, 1082–1089 (2012).
  49. Guilleme, D. & Veuthey, J.-L. Theory and Practice of UHPLC and UHPLC–MS. in *Handbook of Advanced Chromatography /mass Spectrometry Techniques* 1–38 (Elsevier, 2017).
  50. Díaz-García, M. C., Obón, J. M., Castellar, M. R., Collado, J. & Alacid, M. Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chem.* **138**, 938–949 (2013).
  51. Gras, C. C., Carle, R. & Schweiggert, R. M. Determination of anthocyanins from black carrots by UHPLC-PDA after ultrasound-assisted extraction. *J. Food Compos. Anal.* **44**, 170–177 (2015).
  52. Fibigr, J., Šatínský, D. & Solich, P. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **143**, 204–213 (2017).
  53. Caprioli, G. *et al.* Comparison of two different isolation methods of benzimidazoles and their metabolites in the bovine liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–diode array detection. *J. Chromatogr. A* **1217**, 1779–1785 (2010).
  54. Gras, R., Luong, J. & Shellie, R. A. Gas chromatography with diode array detection in series with flame ionisation detection. *J. Chromatogr. A* **1500**, 153–159 (2017).
  55. Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S. & Sagratini, G. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food Chem.* **221**, 689–697 (2017).
  56. Li, D., Meng, X. & Li, B. Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. *J. Food Compos. Anal.* **47**, 1–7 (2016).
  57. Brauch, J. E. *et al.* Characterization of anthocyanins in novel Chilean maqui berry clones by HPLC–DAD–ESI/MS<sup>n</sup> and NMR-spectroscopy. *J. Food Compos. Anal.* **58**, 16–22 (2017).
  58. Ji, M., Li, C. & Li, Q. Rapid separation and identification of phenolics in crude red grape skin extracts by high performance liquid chromatography coupled to diode array detection

- and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1414**, 138–146 (2015).
59. Sparkman, O. D. *et al.* Mass Spectrometry Instrumentation. in *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide* 89–148 (Elsevier, 2011).
  60. Crotti, S., Isak, I. & Traldi, P. Advanced spectroscopic detectors for identification and quantification: Mass spectrometry. in *Liquid Chromatography* 431–462 (Elsevier, 2017).
  61. Blasco, C. & Picó, Y. Liquid chromatography-mass spectrometry. in *Food Toxicants Analysis* 509–559 (Elsevier, 2007).
  62. Vrhovsek, U., Masuero, D., Palmieri, L. & Mattivi, F. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *J. Food Compos. Anal.* **25**, 9–16 (2012).
  63. Papoušková, B. *et al.* Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic. *J. Chromatogr. A* **1218**, 7581–7591 (2011).
  64. Pati, S., Liberatore, M. T., Gambacorta, G., Antonacci, D. & La Notte, E. Rapid screening for anthocyanins and anthocyanin dimers in crude grape extracts by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 3864–3868 (2009).
  65. Wang, J., Zhao, B., Wang, X. & Zhang, J. Preparation and characterization of sulfated galactomannan from guar gum: Optimization of reaction conditions by BBD and molecule conformational studies. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **43**, 889–896 (2012).
  66. Vera Candioti, L., De Zan, M. M., Cámara, M. S. & Goicoechea, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* **124**, 123–138 (2014).
  67. Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M. & Barroso, C. G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Anal. Chim. Acta* **732**, 100–104 (2012).
  68. Hornedo-Ortega, R., Krisa, S., Carmen García-Parrilla, M. & Richard, T. Effects of gluconic and alcoholic fermentation on anthocyanin composition and antioxidant activity of beverages made from strawberry. *LWT - Food Sci. Technol.* **69**, 382–389 (2016).

## 9. APÉNDICES

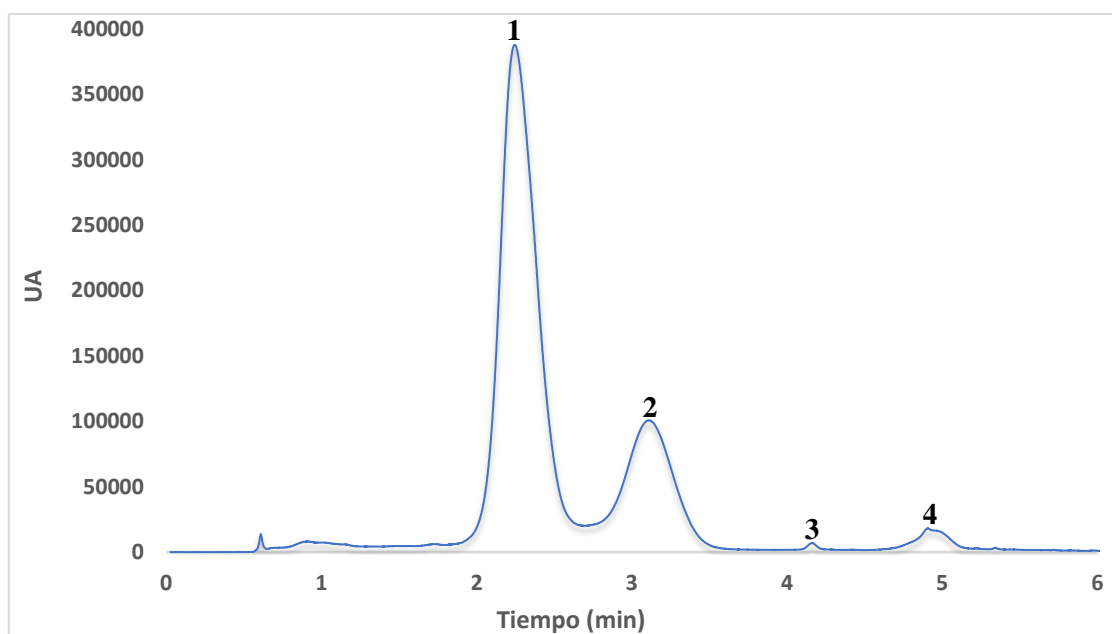
### APÉNDICE 1

*Tabla 20. Diseño de experimentos Box-Behnken para 6 variables (UAE) con la cuantificación de compuestos fenólicos y antocianinas*

Exp.	MeOH	T <sup>a</sup>	Amplitud	Ciclo	pH	Ratio	C. fenólicos (mg/g)	Antocianinas (mg/g)
1	0	0	-1	0	-1	-1	26,0986	0,2171
2	0	0	1	0	-1	-1	18,5110	0,2615
3	0	0	-1	0	1	-1	21,4867	0,1365
4	0	0	1	0	1	-1	25,7467	0,1970
5	0	0	-1	0	-1	1	26,9649	0,2077
6	0	0	1	0	-1	1	28,8431	0,2384
7	0	0	-1	0	1	1	22,2841	0,1576
8	0	0	1	0	1	1	21,7843	0,1637
9	0	-1	0	-1	-1	0	24,0819	0,1643
10	0	1	0	-1	-1	0	28,7254	0,2148
11	0	-1	0	1	-1	0	26,3689	0,2344
12	0	1	0	1	-1	0	31,8215	0,2609
13	0	-1	0	-1	1	0	19,2948	0,1468
14	0	1	0	-1	1	0	29,2005	0,2329
15	0	-1	0	1	1	0	22,8663	0,1866
16	0	1	0	1	1	0	26,1428	0,2598
17	-1	0	-1	-1	0	0	14,7206	0,1363
18	1	0	-1	-1	0	0	27,3069	0,0916
19	-1	0	1	-1	0	0	18,0994	0,1461
20	1	0	1	-1	0	0	26,0860	0,0885
21	-1	0	-1	1	0	0	19,0437	0,1621
22	1	0	-1	1	0	0	25,0011	0,1090
23	-1	0	1	1	0	0	21,5122	0,2373
24	1	0	1	1	0	0	31,5838	0,1361
25	0	-1	-1	0	0	-1	19,2932	0,1715
26	0	1	-1	0	0	-1	26,9631	0,2254
27	0	-1	1	0	0	-1	31,3007	0,2212
28	0	1	1	0	0	-1	37,6816	0,2740

29	0	-1	-1	0	0	1	19,2219	0,1554
30	0	1	-1	0	0	1	27,2274	0,2580
31	0	-1	1	0	0	1	20,1170	0,1790
32	0	1	1	0	0	1	36,8374	0,2498
33	-1	-1	0	0	-1	0	11,4660	0,1442
34	1	-1	0	0	-1	0	25,7813	0,0900
35	-1	1	0	0	-1	0	13,0702	0,2401
36	1	1	0	0	-1	0	23,5915	0,1200
37	-1	-1	0	0	1	0	13,9591	0,1531
38	1	-1	0	0	1	0	19,3609	0,0817
39	-1	1	0	0	1	0	15,0146	0,2630
40	1	1	0	0	1	0	22,1659	0,1234
41	-1	0	0	-1	0	-1	17,9530	0,1567
42	1	0	0	-1	0	-1	20,6120	0,0877
43	-1	0	0	1	0	-1	16,4591	0,2045
44	1	0	0	1	0	-1	18,0549	0,1046
45	-1	0	0	-1	0	1	15,7600	0,1019
46	1	0	0	-1	0	1	19,6321	0,0799
47	-1	0	0	1	0	1	15,6713	0,1724
48	1	0	0	1	0	1	23,9645	0,1145
49	0	0	0	0	0	0	24,9125	0,1740
50	0	0	0	0	0	0	25,4911	0,1756
51	0	0	0	0	0	0	24,0611	0,2079
52	0	0	0	0	0	0	24,8860	0,1847
53	0	0	0	0	0	0	23,0059	0,2015
54	0	0	0	0	0	0	25,8518	0,2206

## APÉNDICE 2



**Figura 26.** Cromatograma UV-Vis ( $\lambda = 499 \text{ nm}$ ) en el que se muestran las 4 antocianinas presentes en la aronia negra.

Picos: (1) cianidina-3-O-galactósido, (2) cianidina-3-O-glucósido, (3) cianidina-3-O-arabinósido, (4) cianidina-3-O-xilósido.

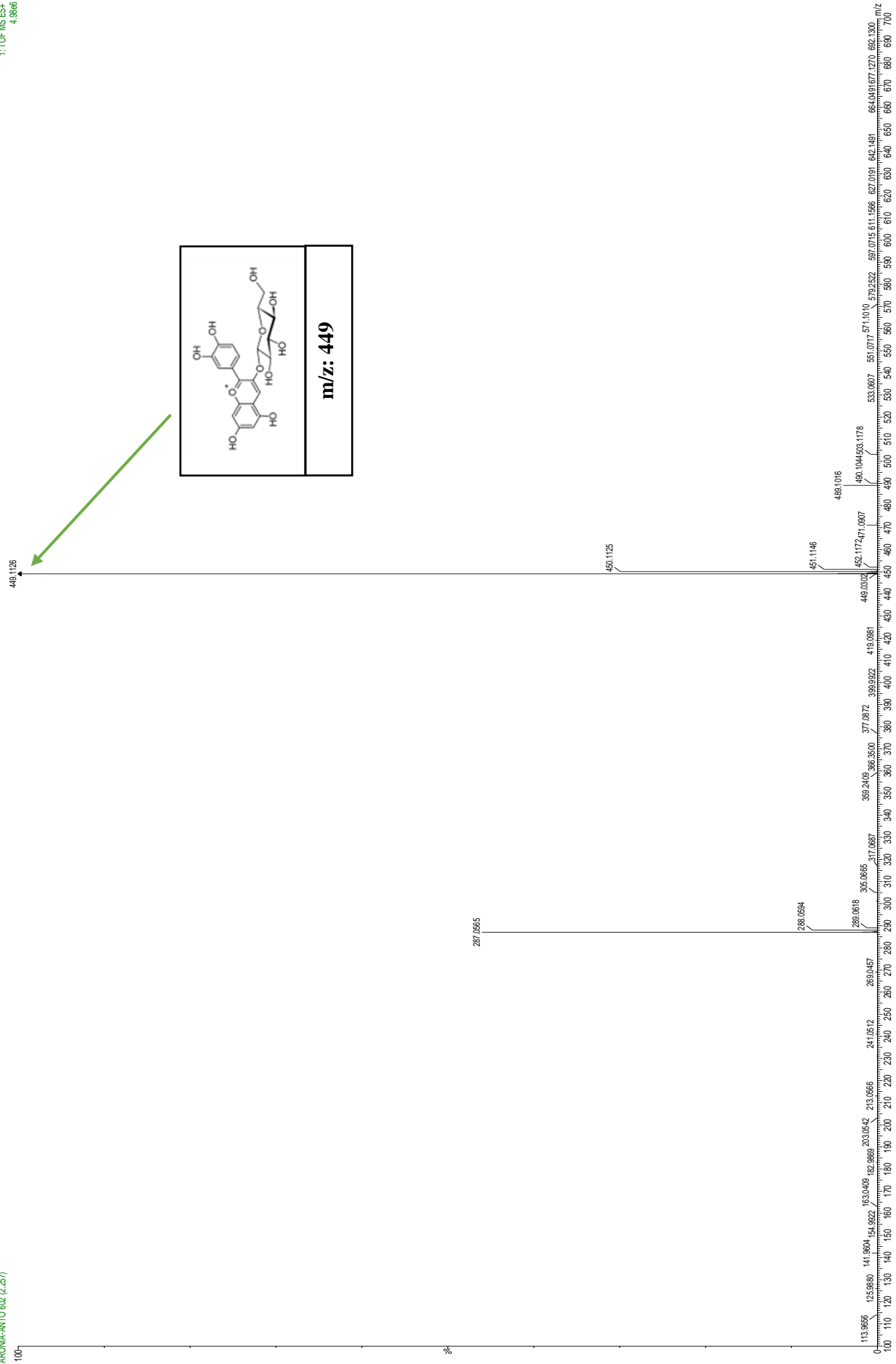
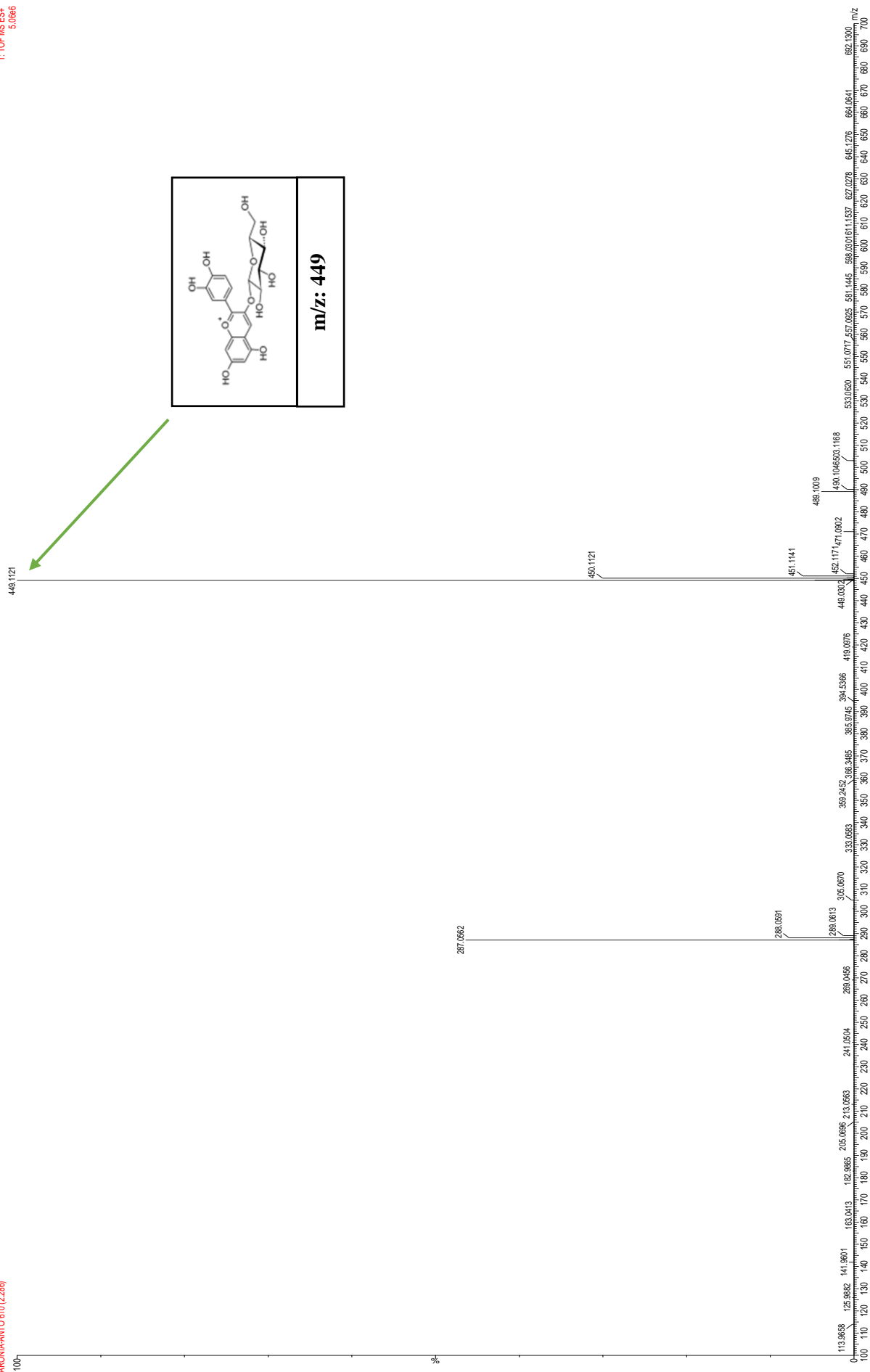
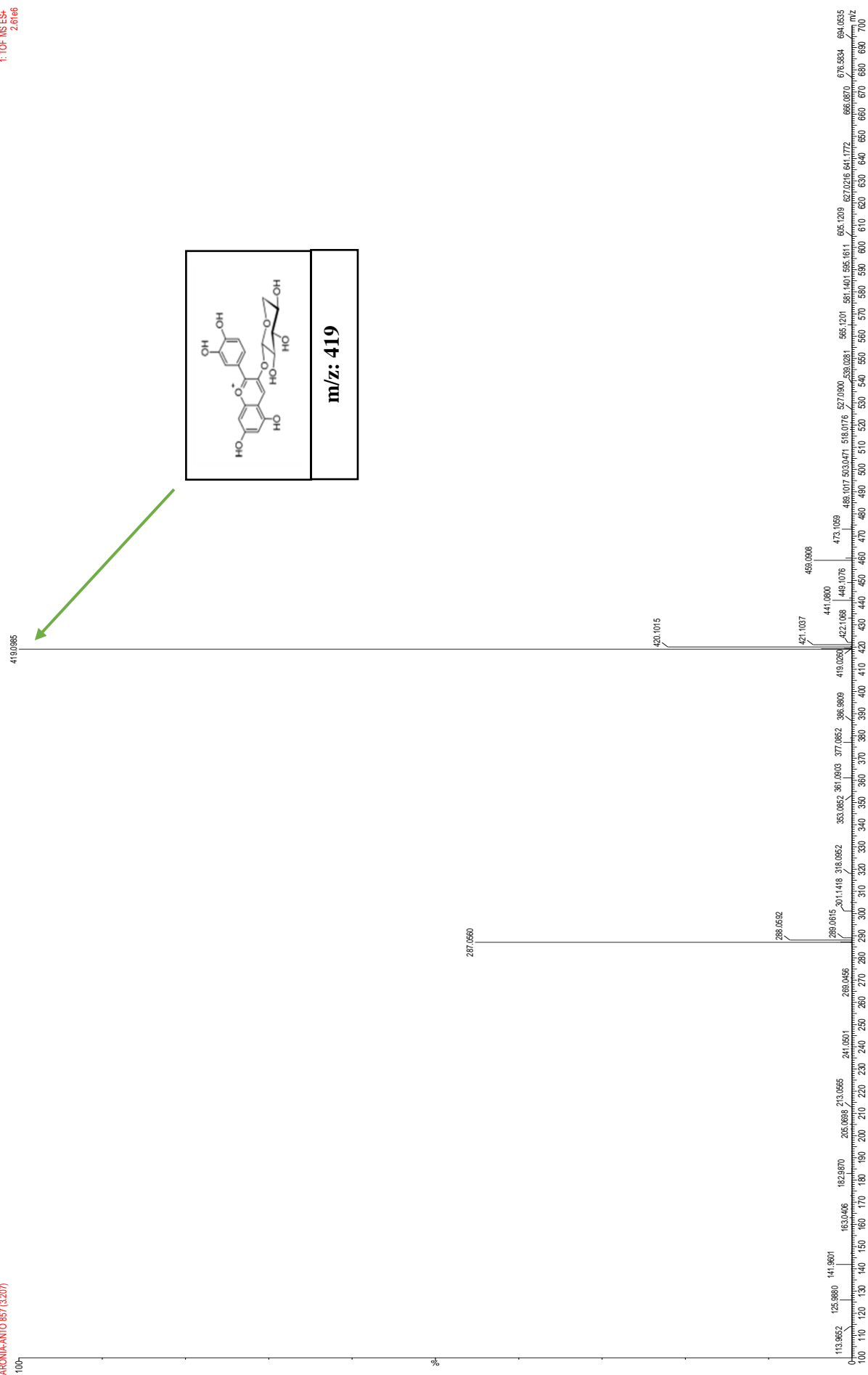


Figura 27. Espectro de masas correspondiente a la cianidina-3-O-galactósido



**Figura 28.** Espectro de masas correspondiente a la cianidina-3-O-glucósido





**Figura 29.** Espectro de masas correspondiente a la cianidina-3-O-arabinósido

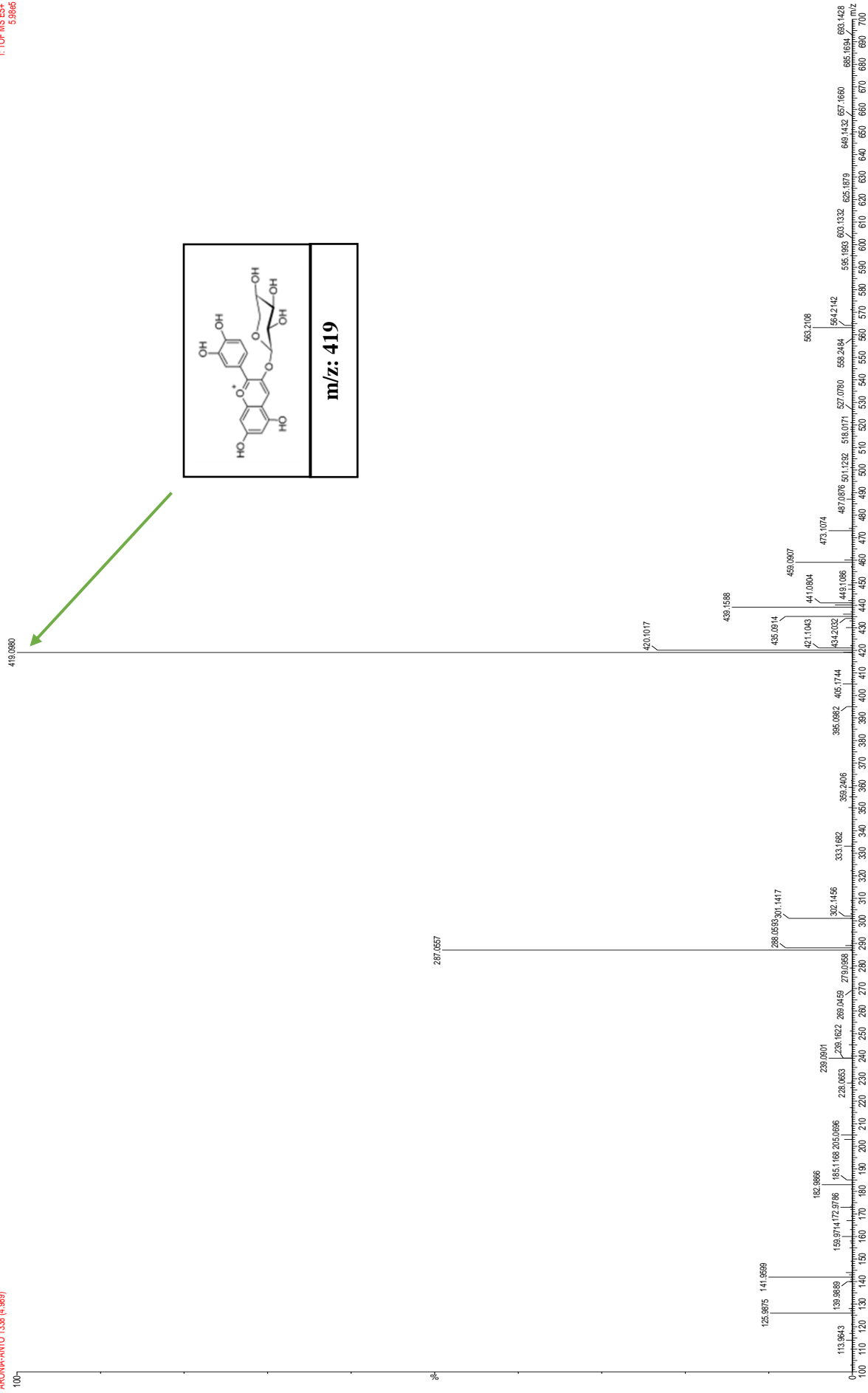


Figura 30. Espectro de masas correspondiente a la cianidina-3-O-xilósido

### APÉNDICE 3

**Tabla 21.** Deseabilidad prevista y observada del diseño de experimentos Box-Behnken para 6 variables (UAE)

Exp.	MeOH	T <sup>a</sup>	Amplitud	Ciclo	pH	Ratio	Deseabilidad prevista	Deseabilidad observada
1	0	0	-1	0	-1	-1	0,4921	0,6282
2	0	0	1	0	-1	-1	0,64791	0,5013
3	0	0	-1	0	1	-1	0,4102	0,3338
4	0	0	1	0	1	-1	0,6631	0,5733
5	0	0	-1	0	-1	1	0,5803	0,6240
6	0	0	1	0	-1	1	0,6190	0,7358
7	0	0	-1	0	1	1	0,3644	0,4064
8	0	0	1	0	1	1	0,4985	0,4121
9	0	-1	0	-1	-1	0	0,4371	0,4574
10	0	1	0	-1	-1	0	0,7084	0,6763
11	0	-1	0	1	-1	0	0,6788	0,6726
12	0	1	0	1	-1	0	0,8405	0,8509
13	0	-1	0	-1	1	0	0,3345	0,3208
14	0	1	0	-1	1	0	0,7120	0,7301
15	0	-1	0	1	1	0	0,4713	0,4889
16	0	1	0	1	1	0	0,7368	0,7203
17	-1	0	-1	-1	0	0	0,2533	0,1900
18	1	0	-1	-1	0	0	0,1716	0,1911
19	-1	0	1	-1	0	0	0,3445	0,2938
20	1	0	1	-1	0	0	0,0804	0,1575
21	-1	0	-1	1	0	0	0,3206	0,3498
22	1	0	-1	1	0	0	0,2089	0,2782
23	-1	0	1	1	0	0	0,5925	0,5574
24	1	0	1	1	0	0	0,4492	0,4712
25	0	-1	-1	0	0	-1	0,4864	0,3754
26	0	1	-1	0	0	-1	0,6431	0,6657
27	0	-1	1	0	0	-1	0,6800	0,7419
28	0	1	1	0	0	-1	0,8739	1,0
29	0	-1	-1	0	0	1	0,4176	0,3392

<b>30</b>	0	1	-1	0	0	1	0,7652	0,7426
<b>31</b>	0	-1	1	0	0	1	0,4824	0,4105
<b>32</b>	0	1	1	0	0	1	0,8649	0,9204
<b>33</b>	-1	-1	0	0	-1	0	0,0	0,0
<b>34</b>	1	-1	0	0	-1	0	0,3011	0,1680
<b>35</b>	-1	1	0	0	-1	0	0,3911	0,2247
<b>36</b>	1	1	0	0	-1	0	0,4242	0,3090
<b>37</b>	-1	-1	0	0	1	0	0,0	0,1893
<b>38</b>	1	-1	0	0	1	0	0,0	0,0527
<b>39</b>	-1	1	0	0	1	0	0,4569	0,3573
<b>40</b>	1	1	0	0	1	0	0,2941	0,3024
<b>41</b>	-1	0	0	-1	0	-1	0,2670	0,3128
<b>42</b>	1	0	0	-1	0	-1	0,0	0,1181
<b>43</b>	-1	0	0	1	0	-1	0,3211	0,3497
<b>44</b>	1	0	0	1	0	-1	0,1777	0,1789
<b>45</b>	-1	0	0	-1	0	1	0,0495	0,1361
<b>46</b>	1	0	0	-1	0	1	0,0	0,0
<b>47</b>	-1	0	0	1	0	1	0,2831	0,2764
<b>48</b>	1	0	0	1	0	1	0,3004	0,2914
<b>49</b>	0	0	0	0	0	0	0,5449	0,4987
<b>50</b>	0	0	0	0	0	0	0,5449	0,5135
<b>51</b>	0	0	0	0	0	0	0,5449	0,5628
<b>52</b>	0	0	0	0	0	0	0,5449	0,5256
<b>53</b>	0	0	0	0	0	0	0,5449	0,5251
<b>54</b>	0	0	0	0	0	0	0,5449	0,6307

*En negrita se marca el experimento más deseable de todos, con una deseabilidad máxima de 1.*

#### **APÉNDICE 4**

**Tabla 22.** Cuantificación de compuestos fenólicos y antocianinas en muestras comerciales sólidas de aronia negra aplicando las condiciones óptimas individuales

<b>Muestra</b>	<b>Compuestos fenólicos totales (mg/g)</b>	<b>Antocianinas totales (mg/g)</b>
Aronia liofilizada en polvo “LYO”	34,9415	23,2470
Aronia cruda deshidratada “Salud Viva”	13,4554	2,5728
Cápsulas de bayas de aronia “Vitalingo”	51,1829	26,9411
Granos de bayas de aronia crudas deshidratadas “NaturGreen”	37,1157	0,2982

**Tabla 23.** Cuantificación de compuestos fenólicos y antocianinas en muestras comerciales sólidas de aronia negra aplicando las condiciones óptimas conjuntas

<b>Muestra</b>	<b>Compuestos fenólicos totales (mg/g)</b>	<b>Antocianinas totales (mg/g)</b>
Aronia liofilizada en polvo “LYO”	32,6105	21,9845
Aronia cruda deshidratada “Salud Viva”	12,0526	2,1902
Cápsulas de bayas de aronia “Vitalingo”	50,6458	24,0754
Granos de bayas de aronia crudas deshidratadas “NaturGreen”	35,4224	0,2856